

3. Einfluss von B7-Homologen auf die T-Zell Aktivierung

Im Laufe der Arbeiten mit B7-1 und B7-2 wurden im Rahmen der Sequenzierung des menschlichen Genoms verschiedene Proteine neu identifiziert, deren Proteinsequenzen zu denen der beiden bekannten B7 Moleküle homolog sind. Sie wurden daher unter anderem als B7-H1, B7-H2 und B7-H3 bezeichnet (siehe I.4.).

3.1. B7-H2

Als besonders interessant zeigte sich dabei B7-H2, der Ligand des induzierbaren T-Zell Costimulators ICOS. Eine T-Zellcostimulation über ICOS führt zu verstärkter Proliferation und Zytokinproduktion (Hutloff et al., 1999; Ling et al., 2000; Liang und Sha, 2002).

3.1.1. Expressionsanalyse in Zellen des Immunsystems

Um die Relevanz der B7-H2 Expression zu bestimmen, wurde zunächst das Expressionsmuster von B7-H2 in den Zellen des Immunsystems bestimmt.

PBMC Präparationen von gesunden Blutspendern, dendritische Zellen, Makrophagen sowie B-Zellen zeigten eine gute Expression von B7-H2 in RT-PCR und FACS-Analysen (Abb. 68, 70). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen reifen und unreifen dendritischen Zellen. Demgegenüber wurde die B7-H2 RNA Expression von Makrophagen nach Stimulation mit LPS erhöht (Abb. 68). Die Western Blot Analysen mit dem vorliegenden Antikörper lieferten nur wenig aussagekräftige Daten (Abb. 69).

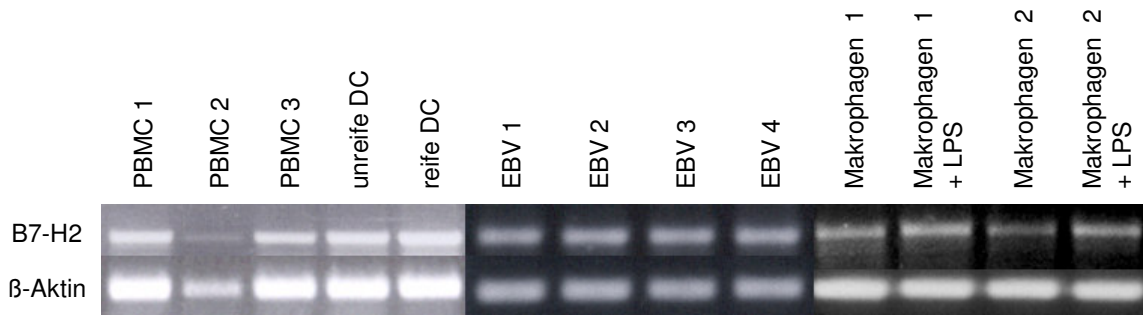


Abb. 68 B7-H2 RT-PCR Analyse professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ)

Die RNA der hergestellten Makrophagen und dendritischen Zellen, von etablierten EBV-Zelllinien sowie mehrerer PBMC Präparationen wurden mit den B7-H2 Analyseprimern und β-Aktin Kontrollprimern in RT-PCR Analysen untersucht. Makrophagen wurden für 24h mit 1µg/ml LPS von *Ps. aeruginosa* stimuliert und dendritische Zellen wurden aus PBMC Präparationen durch Zugabe verschiedener Zytokine differenziert (siehe IV.1.8.).

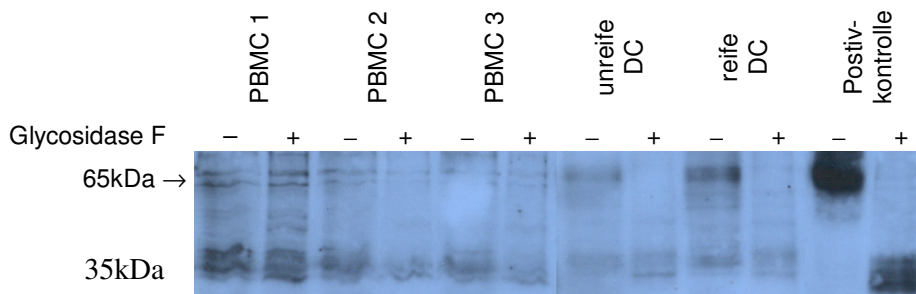


Abb. 69 B7-H2 Western Blot Analyse professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ)

Proteinproben von dendritischen Zellen, von etablierten EBV-Zelllinien sowie mehrerer PBMC Präparationen wurden z.T. deglycosiliert mit Glycosidase F, über ein SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem B7-H2 Antikörper analysiert. Als Positivkontrolle wurde die B7-H2 transfizierte Nierenkarzinomzelllinie MZ1257RC B7H2 Klon 3 mitgeführt. Dendritische Zellen wurden aus PBMC Präparationen durch Zugabe verschiedener Zytokine differenziert (siehe IV.1.8.).

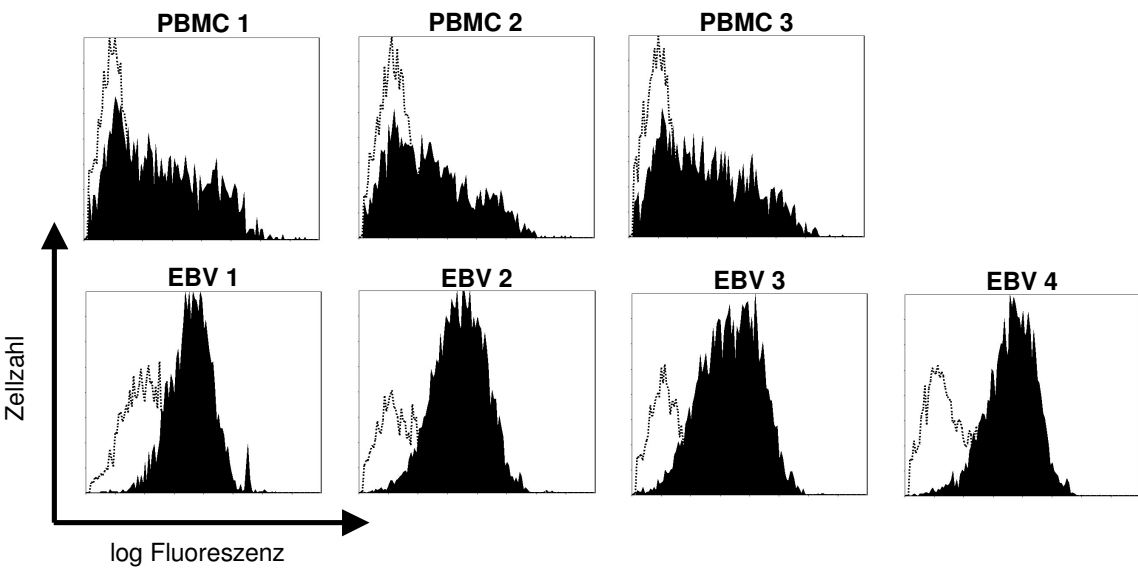


Abb. 70 B7-H2 FACS-Analyse von PBMC und EBV-Zelllinien
PBMC Präparationen gesunder Blutspender und etablierte EBV-Zelllinien von Nierenkarzinompatienten (1, 2) und gesunden Blutspendern (3, 4) wurden mit einem B7-H2 Antikörper und anschließend mit einem FITC-markierten Zweitantikörper inkubiert ■. Zur Kontrolle wurde ein IgG-Kontrollantikörper eingesetzt ▨.

3.1.2. B7-H2 Expressionsanalysen in Tumorzellen

Verschiedene Tumorzelllinien sowie Tumor- und Normalgewebeproben unterschiedlicher Histologie wurden mittels RT-PCR und FACS-Analyse auf ihre B7-H2 Expression untersucht. Alle analysierten Nierenkarzinomzelllinien zeigten eine konstitutive B7-H2 RNA-Expression, während die Frequenz der anderen getesteten Tumorzelllinien variierte. Außerdem zeigte sich eine unterschiedliche IFN γ vermittelte Regulation, sowohl eine Herauf- wie auch Herunterregulation konnte gezeigt werden (Tab. 10). Ein ähnlich heterogenes Expressionsmuster zeigte sich auch bei den Analysen der Gewebeproben (Tab. 11).

Tab. 10 konstitutive und IFN γ induzierte B7-H2 RNA-Expression in Tumorzelllinien

Zelllinie	Anzahl	B7-H2 positiv	IFN γ Regulation	
			↑	↓
Nierenkarzinom	17	17	3	5
Neuroblastom	5	2	1	–
Cervixkarzinom	4	3	1	1
Melanom	10	7	1	–
HNSCC	2	1	1	–

RNA Proben von Tumorzelllinien unbehandelt und mit IFN γ Stimulation (200U/ml, 24h) wurden mit B7-H2 Analyse- und β -Aktin Kontrollprimern in RT-PCR Analysen untersucht. ↑=Heraufregulation, ↓=Herunterregulation, HNSCC=*head and neck squamous cell cancer*

Tab. 11 B7-H2 RT-PCR Analyse von Tumor- und Normalgewebe

Gewebe	Anzahl	B7-H2 positiv		Tumor- gegenüber Normalgewebe	
		Normal	Tumor	↑	↓
Nierenkarzinom	5	4	4	2	1
HNSCC	5	5	4	2	1

RNA Proben von Tumor- und Normalgewebeproben wurden mit B7-H2 Analyse- und β -Aktin Kontrollprimern in RT-PCR Analysen untersucht. ↑=Heraufregulation, ↓=Herunterregulation, HNSCC=*head and neck squamous cell cancer*

3.1.3. Klonierung und Expression eines ICOS-Ig Fusionsproteins

Um zum einen die Zelloberflächenexpression und Bindung klonierter B7-H2 Moleküle in FACS-Analysen bestimmen und zum anderen funktionelle Studien durchführen zu können, wurde ein Expressionsvektor hergestellt, der ein Fusionsprotein aus humanem ICOS und murinem IgG2a-Immunglobulin exprimiert (Abb. 71). Hierbei wurde der extrazelluläre Teil der humanen ICOS cDNA mit der hinge-CH2-CH3 Region der murinen cDNA von IgG2a fusioniert. Durch die ICOS-Signalsequenz und den fehlenden Transmembranbereich von IgG2a wurde die Sezernierung des fertigen Proteins sichergestellt.

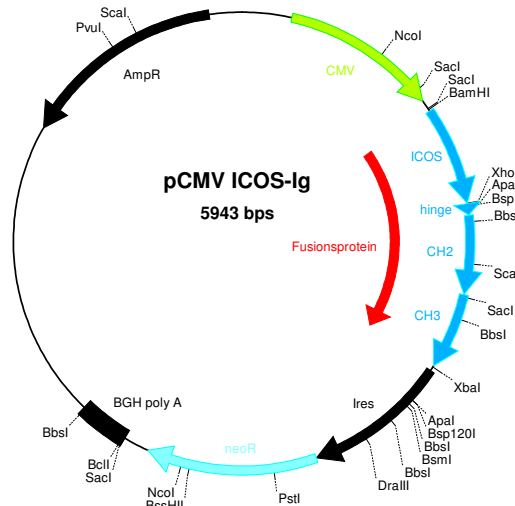


Abb. 71 ICOS-Ig Fusionsvektor

Die cDNA-Moleküle für humanes ICOS und murines IgG2a wurden fusioniert und in einen CMV-IRES Neo Expressionsvektor eingebracht. Der extrazelluläre Teil des humanen ICOS (mit Signalsequenz) wurde an den extrazellulären Teil des murinen IgG2a fusioniert, so dass ein sezernierbares Fusionsprotein exprimiert werden kann.

Die humane embryonale Nierenzelllinie 293 (Graham et al., 1977) konnte erfolgreich mit dem ICOS-Ig Expressionsvektor pCMV ICOS-Ig transfiziert werden. Neomycin resistente Zellen wurden kloniert und etabliert. Aus den Kulturüberständen großer Kulturen konnte über Protein A Säulen ein Protein isoliert werden. Durch Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen humanes ICOS und einem Antikörper gegen murines Immunglobulin konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem isolierten Protein um ein Protein der erwarteten Größe von ca. 42kDa handelt, dass im Western Blot von Antikörpern gegen humanes ICOS und murines IgG erkannt wurde (Abb. 72).

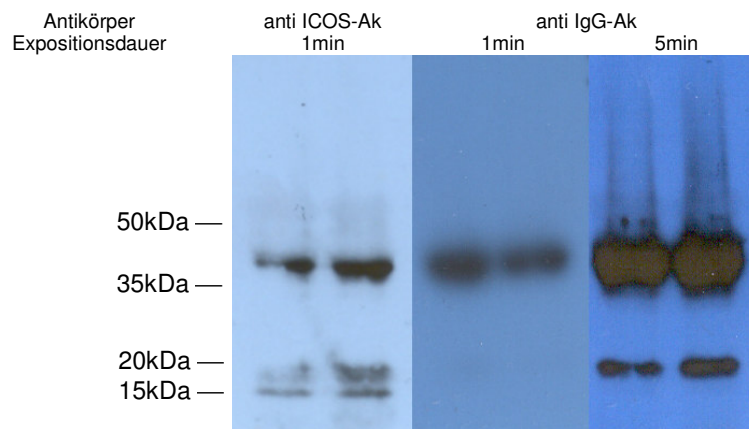


Abb. 72 ICOS-Ig Fusionsprotein: Western Blot anti ICOS- und anti IgG-Antikörper

Der Kulturüberstand von 293-Zellen, die mit dem ICOS-Ig Expressionsvektor transfiziert wurden, wurde über Protein A Säulen aufgereinigt. Die isolierten Proteine wurden in Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen humanes ICOS (linke Spalte) und einem Antikörper gegen murines IgG (mittlere und rechte Spalte) inkubiert.

Neben der erwarteten Bande bei ca. 42kDa, zeigten sich in beiden Western Blot Analysen auch kleinere Banden im Bereich zwischen 15 und 30kDa, was auf eine Instabilität des Fusionsproteins hindeutet. Dies bestätigte sich bei Western Analysen nach kurzer Lagerung des Fusionsproteins, denn mit zunehmender Lagerdauer zeigten sich zunehmend kleine Banden, während die Bande bei ca. 42kDa schwächer wurde.

Daher wurden FACS-Analysen nur mit frisch aufgereinigtem Fusionsprotein durchgeführt. Mit diesem Fusionsprotein war es möglich, die erfolgreiche B7-H2 Transfektion der Nierenkarzinomzelllinien und eine funktionelle Bindung des transfizierten B7-H2 Moleküls festzustellen (Abb. 77). Aufgrund der geringen Stabilität wurde vom Einsatz des Fusionsproteins für Blockierungsversuche verzichtet. Für FACS-Analysen wurde außerdem ein kommerzieller Antikörper eingesetzt, der vom Hersteller aber nur für Western Blot Analysen empfohlen wird. Daher waren mit diesem Produkt keine zuverlässigen Aussagen über die B7-H2 Oberflächenexpression möglich (siehe Kapitel 3.1.5.).

3.1.4. Isolierung von verschiedenen B7-H2 Varianten

In RT-PCR Analysen mit B7-H2 Klonierungsprimern zeigten sich bei der Untersuchung von MZ1257RC drei spezifische Banden. Es konnten drei verschiedene B7-H2 cDNA Moleküle isoliert werden (Abb. 73). Ein weiteres B7-H2 Volllänge cDNA Molekül mit einer Mutation wurde aus einer EBV-Zelllinie isoliert.

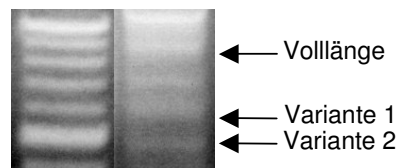
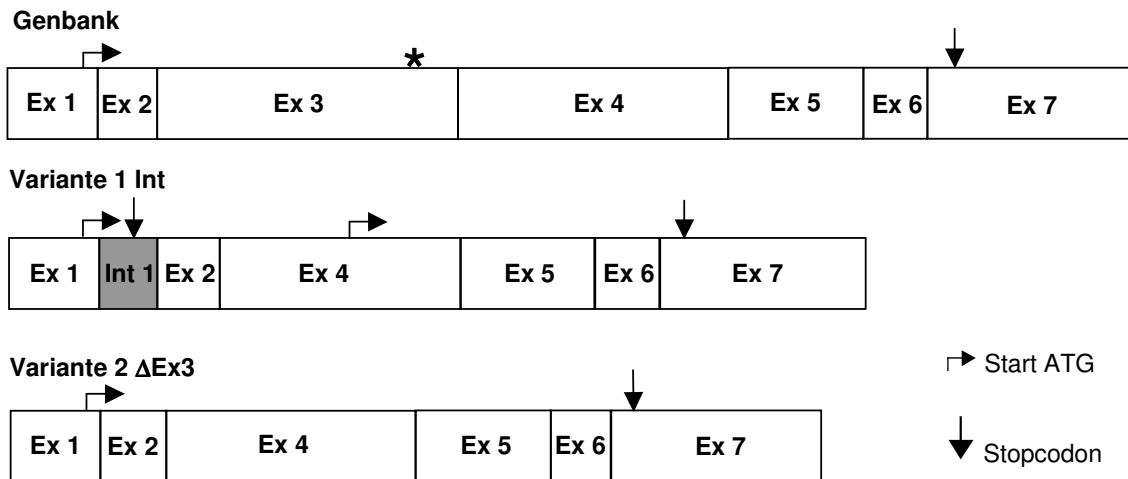


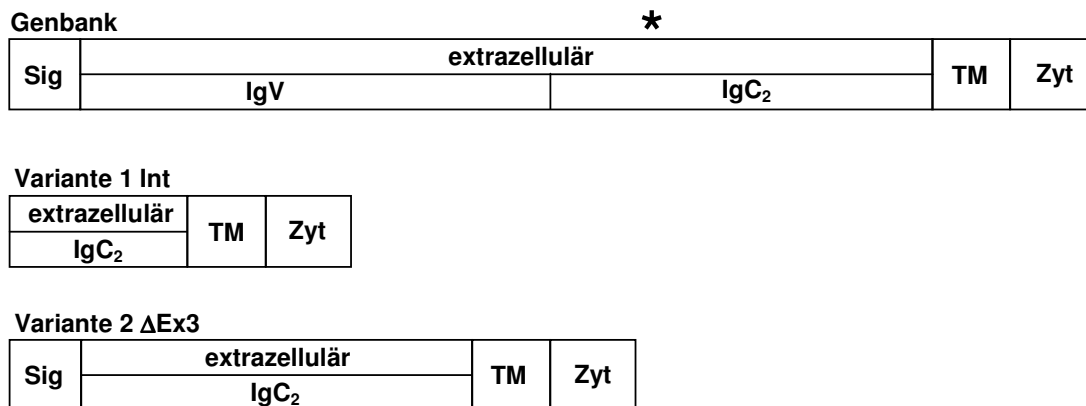
Abb. 73 Isolierung von B7-H2 Varianten aus MZ1257RC

Aus der RNA von MZ1257RC wurden mit den B7-H2 Klonierungsprimern durch RT-PCR die drei verschiedenen B7-H2 cDNA Moleküle gewonnen.

Die Sequenzierung der cDNA Moleküle zeigte, dass die Volllänge B7-H2 Sequenz aus MZ1257RC der in der Datenbank abgelegt Sequenz (NCBI Genbank AF289028) entsprach, während die Sequenzierung der Volllängesequenz aus einer EBV-Zelllinie eine Mutation zeigte (Abb. 74). Den beiden Varianten, die aus MZ1257RC isoliert werden konnten, fehlte Exon 3. Zusätzlich war in der RNA von Variante 1 ein 50bp Fragment aus Intron 1 vorhanden. Dies führt bei der Translation der RNA Variante 1 zu einem frühen Stoppcodon und es entsteht ein Protein, dass nur noch eine Länge von 110 Aminosäuren hat und dem neben der IgV-Domäne auch die Signaldomäne und ein Teil der IgC Domäne fehlt. Das B7-H2 Protein Variante 2 besitzt ein Signalpeptid, während die IgV Domäne fehlt. Die Mutation der Volllängesequenz aus einer EBV-Zelllinie führt zu einem konservativen Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin an Position 128 (Abb. 75).

**Abb. 74 Exon-Intron Struktur der B7H2 Varianten**

Die Exon-Intron Zusammensetzung der verschiedenen aus MZ1257RC isolierten cDNA Moleküle von B7-H2 sind hier schematisch dargestellt. Die Position der Mutation, die in der Volllänge-sequenz einer EBV-Zelllinie identifiziert wurde, ist durch einen Stern markiert. Ex=Exon, Int=Intron

**Abb. 75 Proteindomänen der B7H2 Varianten**

Die Proteindomänen der verschiedenen aus MZ1257RC identifizierten B7-H2 Varianten sind hier schematisch dargestellt. Die Position der Mutation, die in der Sequenz einer EBV-Zelllinie identifiziert wurde und zu einem Aminosäureaustausch an Position 128 von Valin zu Isoleucin führt, ist durch einen Stern markiert. Sig= Signaldomäne, TM=Transmembranbereich, Zyt=zytoplasmatischer Bereich, Ig=Immunglobulindomäne

3.1.5. B7-H2 Gentransfer in Nierenkarzinomzelllinien

RT-PCR Analysen der Nierenkarzinomzelllinie MZ1257RC zeigten, dass diese Zelllinie B7-H2 nur in sehr geringer Menge exprimiert. Nur mit einer sehr hohen Zyklenzahl in der PCR ließen sich RNA-Moleküle nachweisen (Abb. 73). Demgegenüber ergaben Western Blot und FACS-Analysen kein positives Ergebnis.

Daher bot es sich an, B7-H2 in diese Zelllinie zu transfizieren, um mehr über die Funktion des ICOS-Liganden zu lernen. Dies bietet auch die Möglichkeit, ein zelluläres Vakzin analog zu B7-1 und B7-2 herzustellen und MLTC-Analysen analog zu den Versuchen mit B7-1 und B7-2 durchzuführen.

Die vier cDNA Moleküle (Volllänge EBV, Volllänge Genbank MZ1257RC, Variante 1 und Variante 2) für humanes B7-H2 wurden über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Expressionsvektor pCMV Ires Neo eingebracht (Abb. 76).

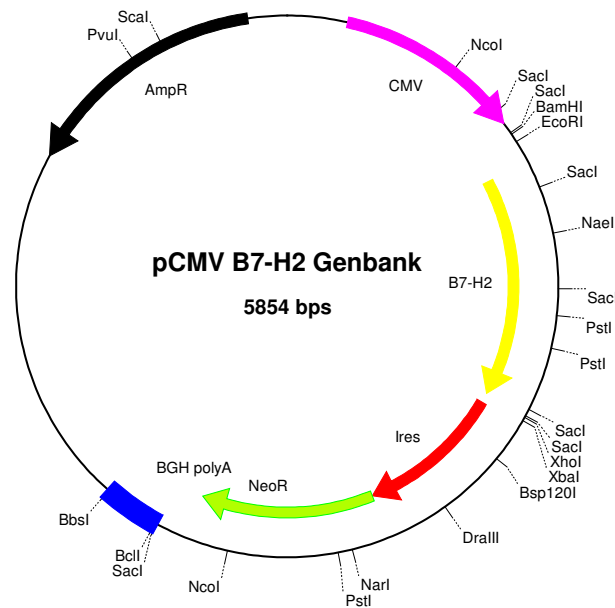


Abb. 76 B7-H2 Expressionsvektor

Die cDNA Moleküle für das humane B7-H2 wurden in den Expressionsvektor pCMV Ires Neo eingesetzt. Die neuen Expressionsvektoren erhielten die Bezeichnungen pCMV B7-H2 Volllänge MZ1257RC, Volllänge EBV, Variante 1 und Variante 2.

Die Expressionsvektoren wurden anschließend in die Nierenkarzinomzelllinie MZ1257RC transfiziert. Nur Kulturen, die mit der B7-H2 Volllänge EBV transfiziert wurden, konnten stabil in Kultur etabliert werden. In FACS-Analysen, bei denen zum Nachweis der funktionellen B7-H2 Bindung an ICOS das in dieser Arbeit hergestellte ICOS-Ig Fusionsprotein (siehe 3.1.3.) eingesetzt wurde, zeigten die Primärkulturen unter Selektion mit Neomycin eine gute B7-H2 Oberflächenexpression und funktionelle Bindung an ICOS (Abb. 77). Aufgrund der Bindung an ICOS wurden die Untersuchungen mit dieser Primärkultur fortgesetzt.

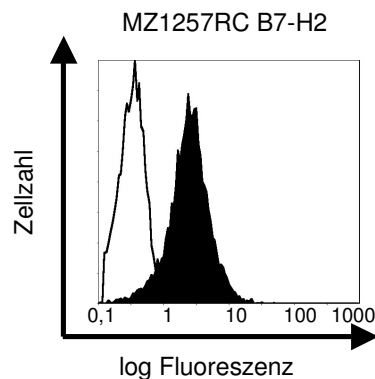


Abb. 77 Funktionelle B7-H2 Oberflächenexpression

Die Nierenkarzinomzelllinie MZ1257RC wurde mit dem B7-H2 Expressionsvektor pCMV B7-H2 Volllänge EBV transfiziert. Eine funktionelle Expression von B7-H2 in den unklonierten Primärkulturen wurde über Bindung des ICOS-Ig Fusionsproteins in einer FACS-Analyse analysiert. Dargestellt ist die Fluoreszenz der transfizierten Zellen ■ gegen die Wildtyp Zelllinie MZ1257RC □.

Die B7-H2 positive Primärkultur wurde kloniert und zwei Klone weiter analysiert. Diese beiden Klone zeigten in FACS-Analysen unterschiedliche Oberflächenexpressionen von B7-H2 (Abb. 78). Dabei zeigte der Klon 2 eine dreifach höhere MFI als Klon 1.

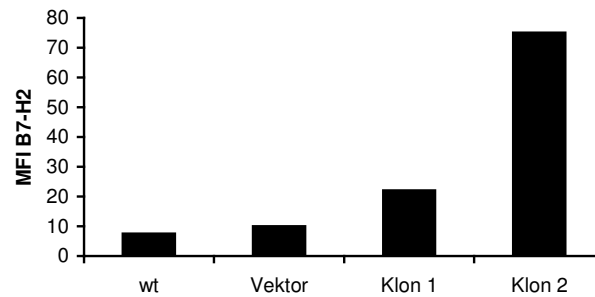


Abb. 78 FACS-Analyse der MZ1257RC B7-H2 Transfektanden

Die Klone der B7-H2 transfizierte Zelllinien MZ1257RC wurden in einer FACS-Analyse mit dem kommerziellen Antikörper der Fa. R&D untersucht. Dargestellt ist die MFI der transfizierten Zelllinien und der Kontrollzelllinien.

Um die Immunogenität von B7-H2 zu überprüfen wurden die beiden B7-H2 positiven Klone ausgesät, fixiert und in MLTC-Versuchen mit OKT3/IL-2 vorstimulierten T-Zellen eingesetzt (Schema Abb. 32). Nach 48 Stunden wurden die Proliferation und die IFN γ , IL-10, GM-CSF Zytokinsekretion der T-Zellen analysiert. Es zeigte sich weder in der Proliferations- noch den Zytokinsekretionsanalysen eine signifikante T-Zell Aktivierung (Abb. 79).

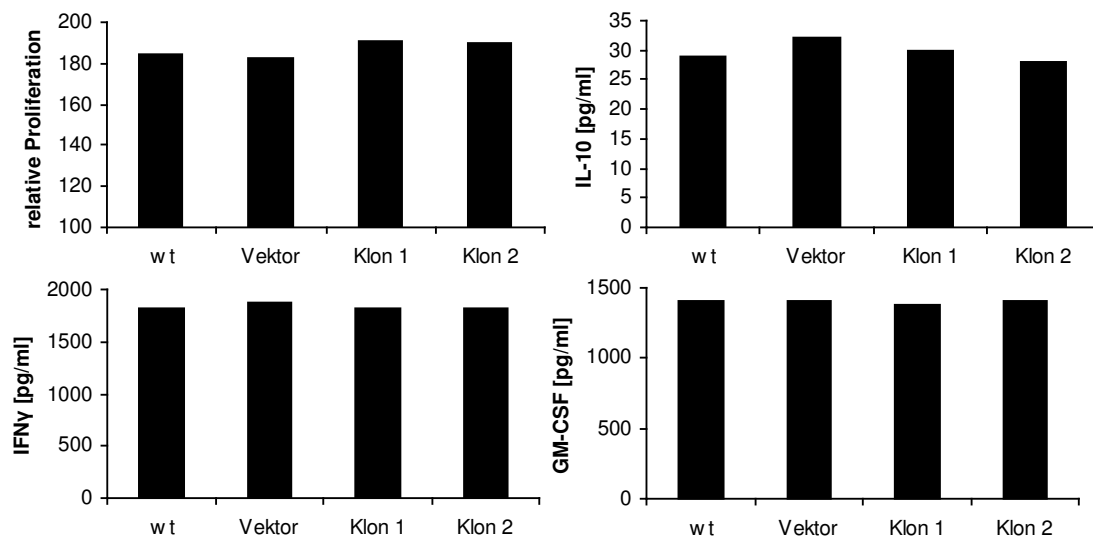


Abb. 79 Keine T-Zell Aktivierung durch B7-H2 exprimierende Tumorzelllinien

OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden mit fixierten MZ1257RC (wt), Vektorkontroll- und B7-H2 transfizierten Nierenkarzinomzellen für 48 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden Proliferation (MTS-Test) und Zytokinsekretion (ELISA) analysiert.

3.2. weitere costimulatorische B7 homologe Moleküle

Neben der Analyse von B7-H2 wurde auch die RNA Expression der weiteren B7 homologen Moleküle, B7-H1 und B7-H3, mittels RT-PCR untersucht.

3.2.1. B7-H1

B7-H1, das als Ligand des *programmed death receptors* PD-1 eine negativ regulatorische Rolle bei der T-Zell Stimulation besitzt (Dong et al., 2002; Mazanet und Hughes, 2002), zeigte hierbei eine RNA Expression in allen untersuchten Proben (Abb. 80, 81). Besonders auffällig war, dass IFN γ die B7-H1 Expression in verschiedenen Tumorzelllinien und hier besonders in den Nierenkarzinomzelllinien induzierte (Abb. 81). In allen Nierenkarzinomzelllinien (7/7), den meisten der Neuroblastomzelllinien (4/5) und einem Teil der Melanomzelllinien (2/5) führte die IFN γ Behandlung zu einer Steigerung der B7-H1 RNA Expression. In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass auch in Normalnierenzelllinien mit einer konstitutiven B7-H1 RNA Expression (3/3) diese Expression durch IFN γ induzierbar war (2/3).



Abb. 80 B7-H1 RT-PCR Analyse professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ)

Die RNA der hergestellten Makrophagen und dendritischen Zellen, von etablierten EBV-Zelllinien sowie mehrere PBMC Präparationen wurden mit den B7-H1 Analyseprimern und β -Aktin Kontrollprimern in RT-PCR Analysen untersucht. Makrophagen wurden für 24h mit 1 μ g/ml LPS von *Ps. aeruginosa* stimuliert und dendritische Zellen wurden aus PBMC Präparationen durch Zugabe verschiedener Zytokine differenziert (siehe IV.1.8.).

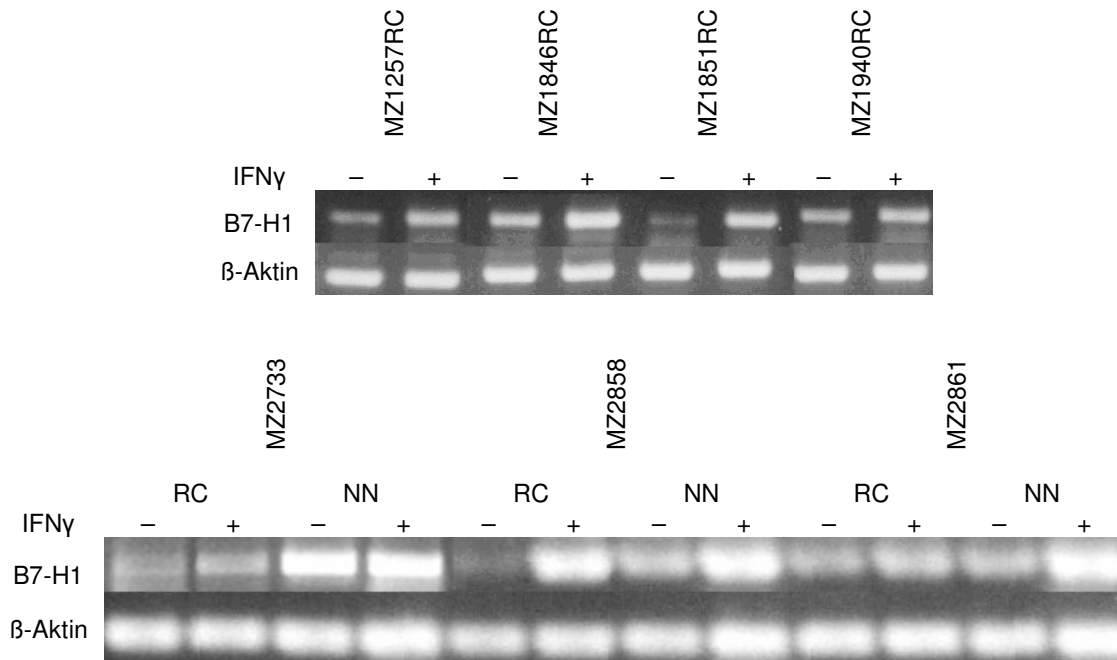


Abb. 81 B7-H1 RT-PCR Analyse Nierenkarzinomzelllinien und Normalnierenzelllinien

Die RNA von etablierten Nierenkarzinomzelllinien und Normalnierenzelllinien wurde mit den B7-H1 Analyseprimern und β -Aktin Kontrollprimern in RT-PCR Analysen untersucht.

3.2.2. B7-H3

Die Rolle von B7-H3 in der T-Zell Costimulation ist bis jetzt erst wenig untersucht. Bekannt ist, dass B7-H3 die T-Zell Aktivierung fördert und dabei an einen bis jetzt noch nicht identifizierten Rezeptor auf den T-Zellen bindet (Chapoval et al., 2001). RT-PCR Analysen der B7-H3 mRNA Expression zeigten eine gute Expression in Makrophagen und dendritischen Zellen und eine schwache bis nicht nachweisbare Expression in PBMC und EBV-Zelllinien (Abb. 82). Die meisten der untersuchten Tumorzelllinien (10/11) zeigten eine basalen B7-H3 mRNA Expression, die durch Inkubation mit IFN γ nicht signifikant verändert wurde (Abb. 83).

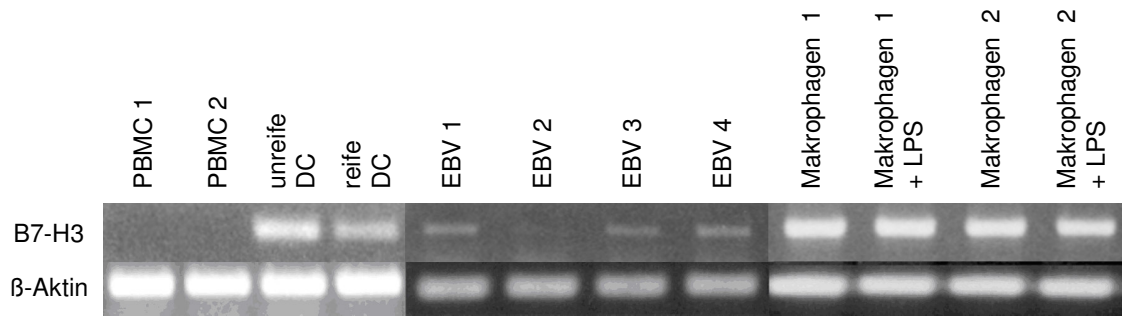


Abb. 82 B7-H2 RT-PCR Analyse professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ)
Die RNA der hergestellten Makrophagen und dendritischen Zellen, von etablierten EBV-Zelllinien sowie mehrerer PBMC Präparationen wurden mit B7-H3 Analyseprimern und β -Aktin Kontrollprimern in RT-PCR Analysen untersucht. Makrophagen wurden für 24h mit 1 μ g/ml LPS von *Ps. aeruginosa* stimuliert und dendritische Zellen wurden aus PBMC Präparationen durch Zugabe verschiedener Zytokine differenziert (siehe IV.1.8.).

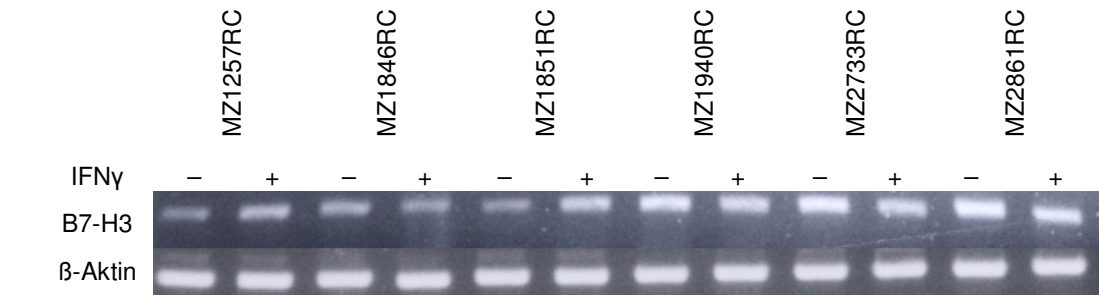


Abb. 83 B7-H3 RT-PCR Analyse Nierenkarzinomzelllinien
Die RNA von etablierten Nierenkarzinomzelllinien wurde mit den B7-H3 Analyseprimern und β -Aktin Kontrollprimern in RT-PCR Analysen untersucht.

4. Proteomanalyse B7 aktivierter T-Zellen

Die Identifikation von Biomarkern für die Detektion einer klinisch signifikanten Immunantwort wäre für die Analyse immuntherapeutischer Studien sehr wertvoll. Bisherige Testsysteme waren nicht in der Lage, einen Überblick über die Immunantwort zu geben, da sie immer nur einzelne Aspekte betrachten konnten. Daher bot sich die Proteomanalyse von T-Zellen an, die mit B7 modifizierten Tumorzellen *in vitro* stimuliert wurden. Durch diese Untersuchungen wurden wertvolle Informationen über grundlegende Mechanismen und Signalwege erwartet (Mosca et al., 2003).

4.1. Analyse des Proteinexpressionsmusters B7 aktivierter T-Zellen

Aufbauend auf den Ergebnissen aus V.1. wurden MLTC-Versuche mit vorstimulierten HLA-A2⁺ T-Zellen aus zwei *buffy coat* Präparationen und den B7-Transfektanten B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3, sowie den Wildtyp MZ1257RC Zellen und der Vektorkontrolltransfektante durchgeführt. Nach 48 Stunden Inkubation (Schema Abb. 32) wurden die Kulturüberstände und Zellpellets gewonnen. Zur Kontrolle einer erfolgreichen T-Zell Stimulation wurden die Kulturüberstände auf ihre Zytokinsekretion untersucht. Die ELISA-Analysen zeigten das erwartete Sekretionsmuster für IFN γ , GM-CSF, TNF α und IL-10 was in Abb. 84 für IFN γ und TNF α exemplarisch dargestellt ist.

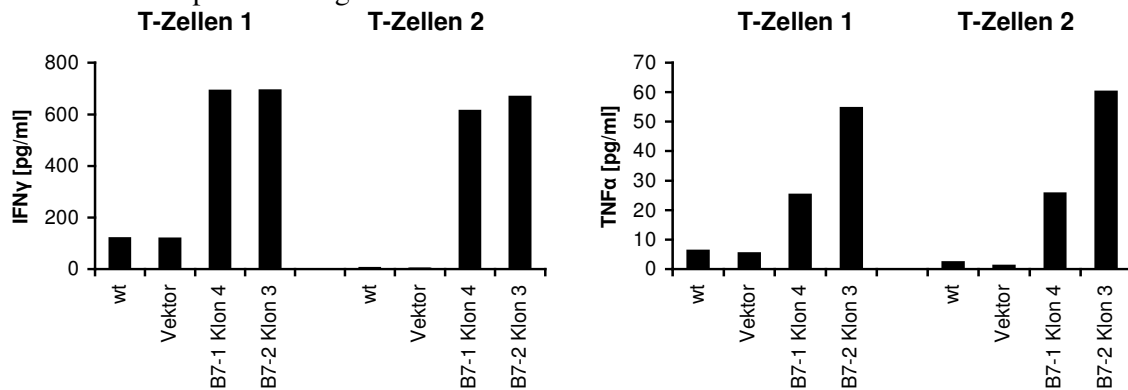


Abb. 84 Zytokinsekretion aktivierter T-Zellen nach Stimulation mit B7 transfizierten Tumorzellen

OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen aus zwei *buffy coat* Präparationen wurden mit fixierten B7 transfizierten Tumorzellen für 48h inkubiert. Anschließend wurden ELISA Analysen auf die Produktion von IFN γ und TNF α durchgeführt.

Nach Aufarbeitung und Proteinbestimmung wurden die Proben durch isoelektrische Fokussierung (pH-Bereich 3-10NL) und SDS-PAGE (13%) aufgetrennt und durch die anschließende Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 85). Bei der anschließenden Spotanalyse konnten auf jedem Gel ca. 1500 Proteinspots detektiert werden. Nach ausführlicher Analyse aller Spots wurden 60 Proteinspots zur Identifikation gegeben, wobei 45 Spots auffällige Unterschiede zwischen der Stimulation mit bzw. ohne B7 zeigten (Tab. 12). Einige unveränderte Spots wurden als ergänzende Kontrollen ebenfalls identifiziert. Die Identitäten aller identifizierten Proteine sind im Anhang X. 4. abgelegt.

Tab. 12 Spotdetektion und -identifizierung T-Zell Proteomanalyse

	Spotzahl	nur B7-1	nur B7-2	B7-1 und B7-2	identifiziert
Gesamt	ca.1500				
Spots zur Identifizierung	60				48
modifiziert	10	0	0	10	10
hoch reguliert	15	3	6	6	11
runter reguliert	20	4	7	9	14
unverändert (Kontrollen)	15	0	0	15	13

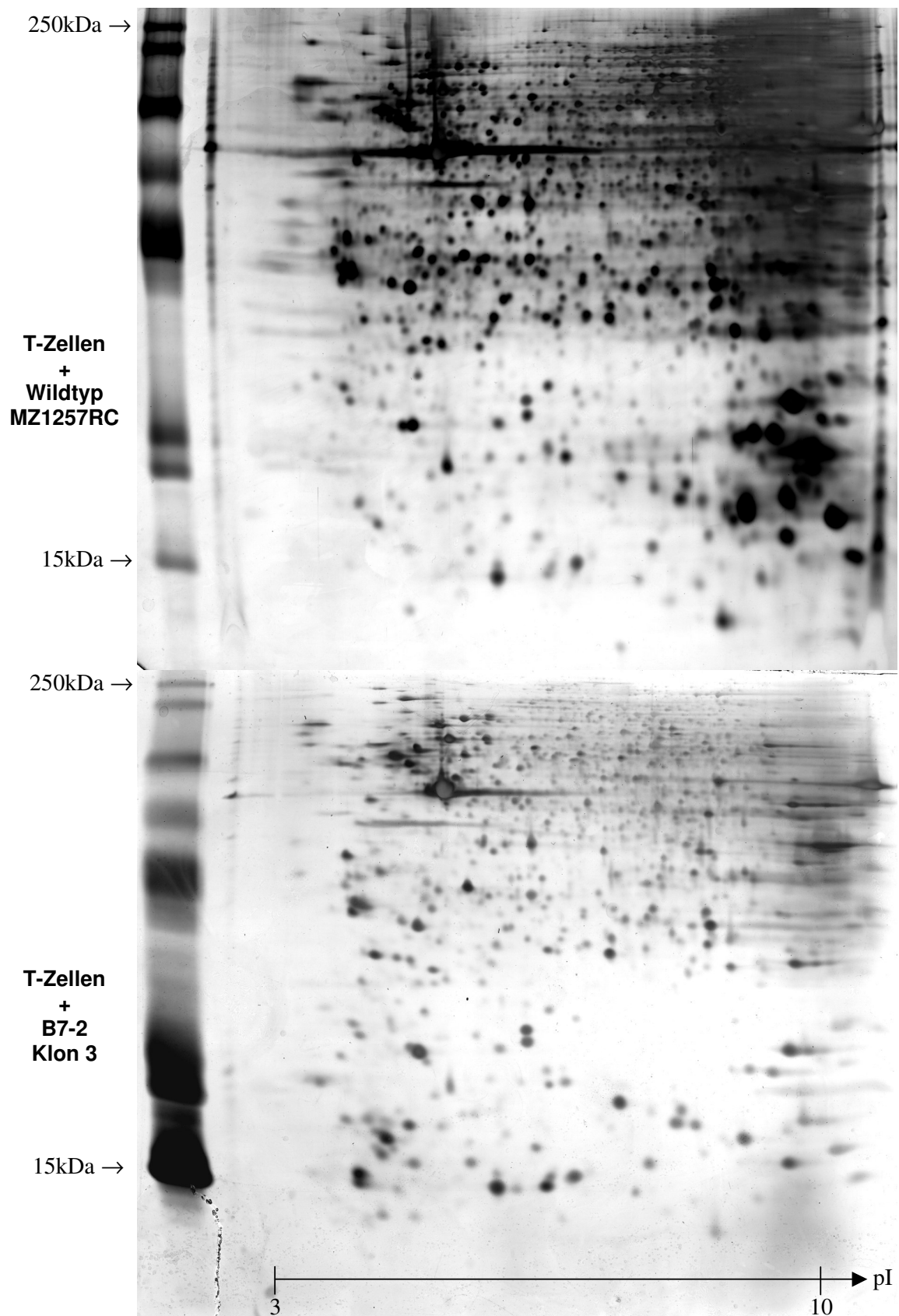


Abb. 85 2D Proteomanalyse von T-Zellen stimuliert mit MZ1257RC und B7-2 Klon 3 Tumorzellen

OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden mit fixierten Tumorzellen für 48h stimuliert. Aus den T-Zellpellets wurden Proteine gewonnen und mittels 2D-Analyse (pH 3-10, 13% SDS-PAGE) analysiert. Die Gele wurden Silber-gefärbt, eingescannt und mit Proteomweaver analysiert. Aus einer Analyse von T-Zellen, die mit Wildtyp MZ1257RC und B7-2 Klon 3 Tumorzellen stimuliert wurden, sind exemplarisch die kompletten Gele dargestellt.

Einige interessante Spots (Tab. 13) sind in Ausschnitten in Abb. 86 dargestellt. Dabei werden hier Proteinspots von T Zellen stimuliert mit Wildtyp MZ1257RC Zellen (oben, repräsentativ auch für die Vektor-Kontrolle) und B7-2 Klon 3 (unten, repräsentativ auch für B7-1 Klon 4) verglichen.

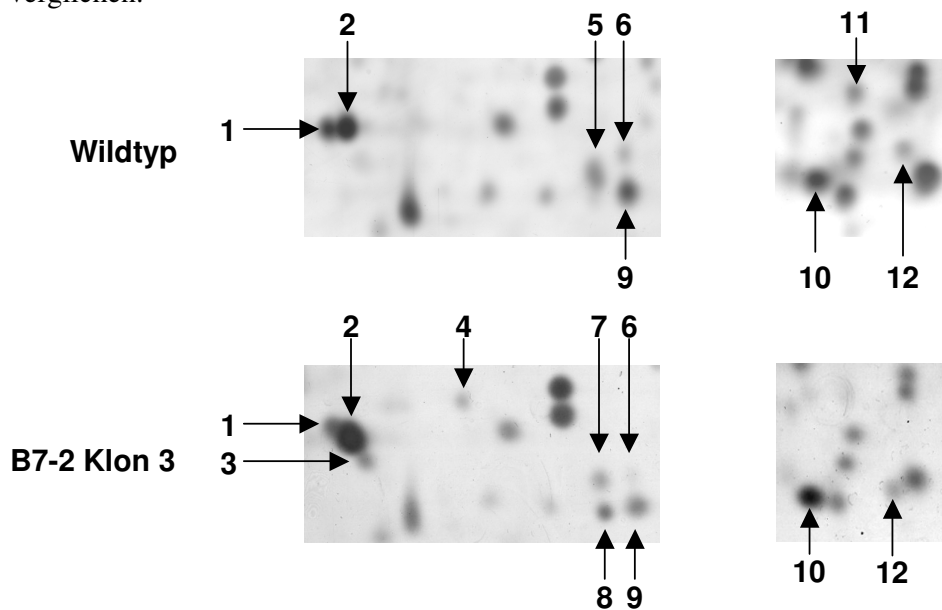


Abb. 86 Detailsansicht 2D Proteomanalyse von T-Zellen stimuliert mit parentalen und B7-2 Klon 3 Tumorzellen
OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden mit fixierten Tumorzellen für 48h inkubiert. Aus den T-Zellpellets wurden Proteine gewonnen und mittels 2D-Analyse (pH 3-10, 13% SDS-PAGE) analysiert. Die Gele wurden Silber-gefärbt, eingescannt und mit Proteomweaver analysiert. Aus den Analysen, für die Wildtyp und B7-2 Klon 3 Tumorzellen zur Stimulation der T-Zellen 2 eingesetzt wurden, sind jeweils 2 vergleichbare Ausschnitte dargestellt.

Tab. 13 Proteomanalyse von T-Zellen stimuliert mit parentalen und B7-2 Klon 3 Tumorzellen, Spots aus Abb. 86

Proteinspot	Identifizierung
1	Glia Reifungsfaktor
2	Initiationsfaktor 5a
3	n.i.
4	n.i.
5	Prefoldin 5
6	n.i.
7	Prefoldin 5
8	Prefoldin 5
9	Ubiquitin Proteinligase
10	RNA bindende regulatorische Untereinheit
11	n.i.
12	GrpE ähnliches Protein

Identifizierung der Spots aus Abb. 86 (n.i. = nicht identifiziert)

Nach Stimulation mit B7 transfizierten Tumorzellen wurde in den aktivierten T-Zellen die Expression der unidentifizierten Proteine Nr.3 und 4 induziert. Die Proteine Glia Reifungsfaktor (Nr. 1), Prefoldin 5 (Nr. 5, 7, 8) und GrpE ähnliches Protein (Nr. 12) wurden durch B7 Stimulation in ihrer Expression modifiziert, so dass Sie ihre Lage auf den Proteingelen veränderten. Die Proteine Initiationsfaktor 5a (Nr. 2) und RNA bindende Untereinheit (Nr. 10) verstärkten ihre Expression durch B7 Costimulation, während die Expression der unidentifizierten Proteine Nr.6, 11 und der Ubiquitin Proteinligase (Nr. 9) unter diesen Kulturbedingungen abnahm.

Es konnten 48 der 60 Spots Proteinspots mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Die Analyse eines Proteinspots ist in Abb. 87 und 88 exemplarisch an Spot 1 dargestellt. Der Proteinspot wurde enzymatisch mit der Endoproteinase Lys-C gespalten und über HPLC gereinigt. Anschließend wurden die Peptide in einem *peptide mass fingerprint* analysiert. Die Analyse der identifizierten Peptidmassen in der Datenbanksuchmaschine MASCOT (Hirosawa et al., 1993; Perkins et al., 1999) führte mit einer Sequenzabdeckung von 48% zur Identifikation des humanen Glia Wachstumsfaktor. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden von den Massen 2042 und 2194 Da zusätzlich Tandem-MS Analysen durchgeführt, die das erste Ergebnis bestätigten. Alle Ergebnisse zusammen waren statistisch signifikant ($p < 0.05$).

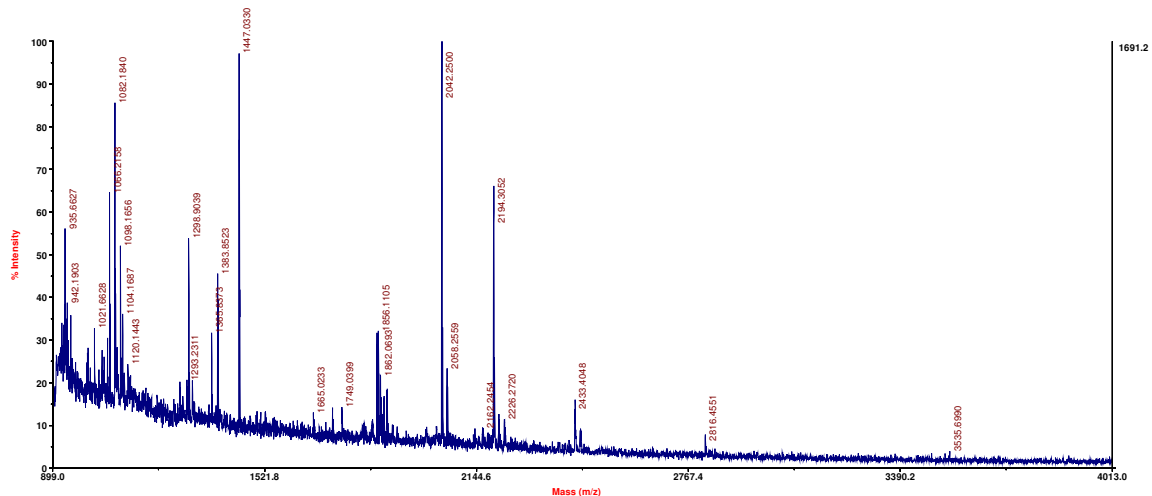


Abb. 87 *Peptide mass fingerprint* Spot 1

Spot 1 wurde mit der Endoproteinase Lys-C enzymatisch gespalten. Die entstanden Peptide wurden mittels HPLC und anschließender Massenspektrometrie analysiert.

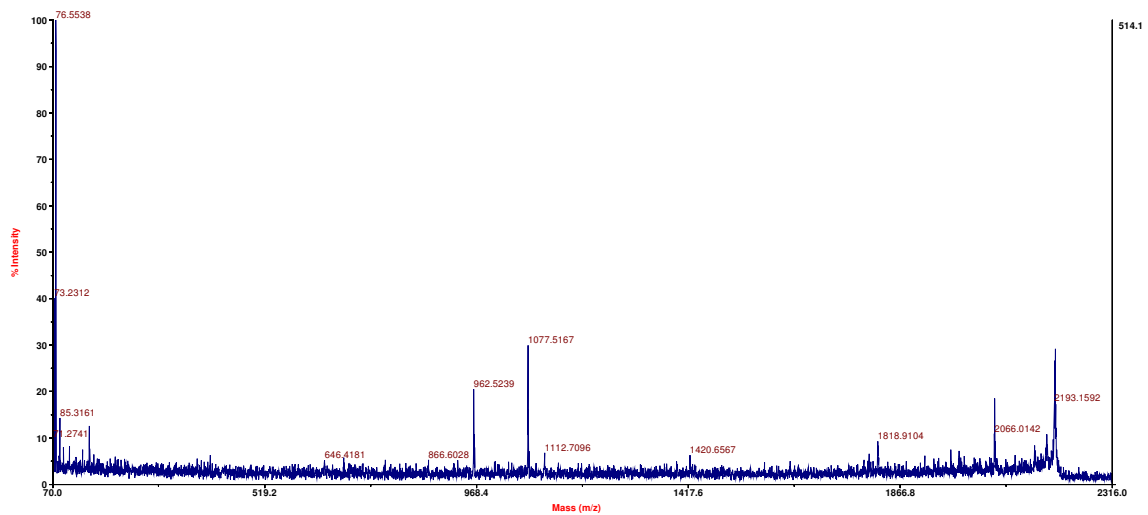


Abb. 88 Tandem-MS zur Identifikation eines Peptids aus Abb.87

Das Peptid der Masse 2194 Da aus Abb. 87 wurde in einer Tandem-MS analysiert.

4.2. Phosphoproteomanalyse B7 aktivierter T-Zellen

Da beim Einsatz von B7-Transfektanden in MLTC-Versuchen auch eine veränderte und verstärkte Signaltransduktion der T-Zellen zu erwarten war, wurden in nachfolgenden Versuchen phosphorylierte Proteine aus Proteinpräparationen von T-Zellen aus MLTC-Reaktionen mit Hilfe des PhosphoProtein Purification Kits aufgereinigt.

Hierzu wurden vorstimulierte T-Zellen für 15min, 60min und 24h mit fixierten Tumorzellen inkubiert. Anschließend wurden die phosphorylierten von den nicht phosphorylierten Proteinen getrennt. Dabei war die Ausbeute an phosphorylierten Proteinen leider so gering ($<150\mu\text{g}$), dass eine aussagekräftige Proteinbestimmung nicht möglich war. Somit musste die gesamte Proteinmenge jedes Versuchsansatzes in jeweils einer Proteomanalyse untersucht werden. Die erhaltenen Analysen gaben somit auch einen quantitativen Eindruck des Phosphorylierungsgrades der Zellen. Wie in Abb. 89 dargestellt, zeigten nur wenige Proteine der unstimulierten T-Zellen Phosphorylierungen. Bei den B7 stimulierten T-Zellen nahm die Menge an phosphorylierten Proteinen mit der Stimulationsdauer von 15min zu 60min zu, während nach 24 Stunden die Menge wieder abnahm. 288 Proteine konnten detektiert werden, wovon bei 40 Proteinen Unterschiede zwischen der T-Zell Stimulation mit B7-1 bzw. B7-2 zeigten (Tab. 14, Abb. 89).

Die Identifikation der phosphorylierten Proteine gestaltete sich leider äußerst schwierig. Es war aufgrund der geringen Spotgröße nicht möglich, diese Proteinspots zu identifizieren. Daher konnten nur 24 eher unauffällige Spots über den Vergleich mit den Proteomanalysen aus V.4.1. identifiziert werden (siehe Anhang X. 5). Dabei handelte es sich zumeist um Proteine, von denen eine Phosphorylierung in der Literatur bereits beschrieben wurde. Zu diesen zählten Splicefaktor p32, Stathmin, Initiationsfaktor 5a (eIF5a), das GTP-Bindeprotein ran und rho GDI oder von denen eine Funktion im Rahmen von Phosphorylierungen bekannt war, wie z.B. Glutathiontransferase Pi (GSTPi).

Tab. 14 Spotdetektion und –identifikation T-Zell Phosphoproteom

Gesamtspotzahl	288	identifiziert
Spots identisch bei B7-1 und B7-2 Stimulation	248	24
nur bei B7-1 Stimulation	5	0
nur bei B7-2 Stimulation	35	0



Abb. 89 Phosphoproteomanalyse vorstimulierte T-Zellen

OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden mit fixierten B7 transfizierten Tumorzellen für 15min, 60min und 24h inkubiert. Aus den T-Zellpellets dieser Stimulationen und von unstimulierten T-Zellen (unstim) wurden Proteine gewonnen, die Phosphoproteine isoliert und mittels 2D-Analyse (pH 3-10, 13% SDS-PAGE) analysiert. Die Proteingele wurden Silber-gefärbt und eingescannt. Von den Analysen, bei denen B7-2 Klon 3 Tumorzellen eingesetzt wurden, sind die kompletten Gele dargestellt.

Ein interessanter Bereich der Gele ist zum Vergleich in Abb. 90 dargestellt. In dem mit einem Kreis markierten Bereich veränderte sich das Phosphorylierungsmuster der Proteinspots im Laufe der Stimulation sehr stark. Die Phosphorylierung des Proteins, das mit dem Pfeil markiert wurde, verschwand nach 24h Stimulation, obwohl sie sogar in den unstimulierten T-Zellen vorhanden war.

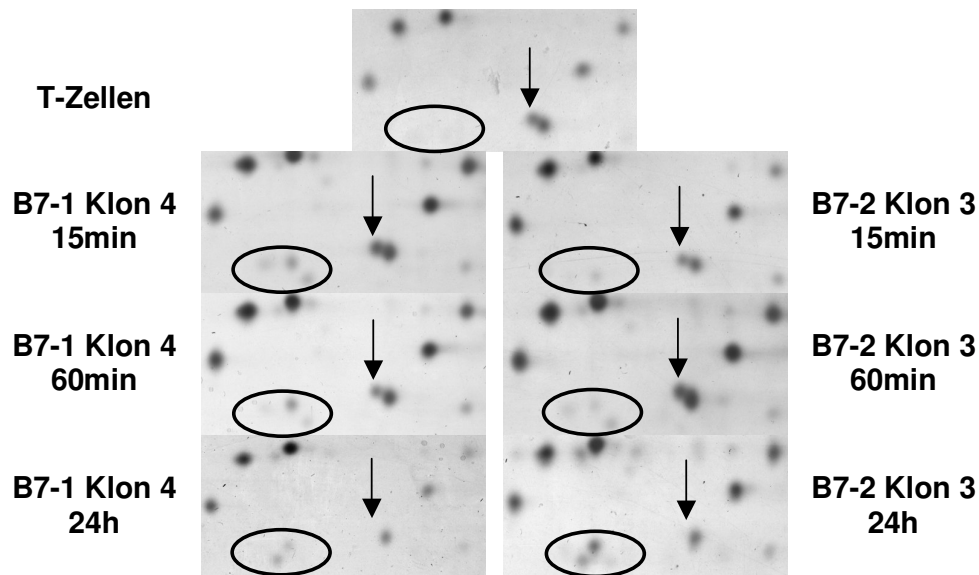


Abb. 90 Detailsansicht der Phosphoproteomanalyse von T-Zellen stimuliert mit B7 transfizierten Tumorzelllinien
 OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden mit fixierten Tumorzellen für 15min, 60min und 24h inkubiert. Aus den T-Zellpellets wurden Proteine gewonnen, die Phosphoproteine isoliert und mittels 2D-Analyse (pH 3-10, 13% SDS-PAGE) analysiert. Die Proteingele wurden Silber-gefärbt und eingescannt. Aus allen Gelbildern wurden vergleichbare Ausschnitte dargestellt. Ein besonders auffälliger Bereich ist mit einem Kreis gekennzeichnet, ebenso wie ein besonders auffälliger Proteinspot (Pfeil).

4.3. Neue Biomarker zur Detektion einer erfolgreichen Immuntherapie

Verschiedene Proteine, die in der Proteom- und Phosphoproteomanalyse identifiziert wurden, wurden in RT-PCR (III. 5.4.3) und Western Blot Analysen auf ihre Eignung als Biomarker eingehend untersucht. Zur Evaluierung wurden RNA- und Proteinproben von MLTC-Versuchen mit vorstimulierten HLA-A2⁺ T-Zellen von gesunden Blutspendern und den B7-Transfektanden B7-1 Klon 4, B7-2 Klon 3, Wildtyp MZ1257RC und Vektor-Kontrolltransfektanden eingesetzt. Nach 48 Stunden Inkubation (Schema Abb. 32) wurden die Zellpellets gewonnen und analysiert.

4.3.1. Stathmin

Dieses ubiquitär vorkommende, phylogenetisch konservierte Protein kommt im Zytoplasma in verschiedenen phosphorylierten und unphosphorylierten Formen vor. Die Expression und Phosphorylierung hängt von der Entwicklung der Zelle ab und wird reguliert in Reaktion auf extrazelluläre Signale die Proliferation oder Differenzierung der Zelle vermitteln. Stathmin ist ein Bestandteil verschiedener *second messenger* Systeme und die phosphorylierten Formen funktionieren als eine Art Relais in der Signaltransduktion und integrieren verschiedene Signale innerhalb der Zelle (Sobel, 1991; Nagasaka et al., 2002).

Die Expression von Stathmin in T-Zellen wurde heraufreguliert durch die Stimulation mit B7, wie sich in den Proteomanalysen (Anhang X. 4), Western Blot Analysen (Abb. 91) und RT-PCR Analysen (Abb. 92) zeigen lässt. Ebenfalls auffällig war das Auftreten einer phosphorylierten Form nach Stimulation mit B7 (Anhang X. 5).

4.3.2. proliferating cellular nuclear antigen (PCNA)

PCNA auch bezeichnet als Cyclin 1 wurde als nukleäres Protein identifiziert, dessen Auftreten mit dem Proliferationsstatus der Zelle korreliert (Bravo, 1986). PCNA ist ein entscheidender Cofaktor der DNA Polymerase delta und spielt eine Rolle in der DNA-Reparatur im Komplex mit p300 (Hasan et al., 2001).

Die Expression von PCNA in T-Zellen wurde stark heraufreguliert durch Stimulierung mit B7-1 und B7-2, wie sich in den Proteom- (Anhang X. 4) und Western Blot Analysen zeigte (Abb. 91).

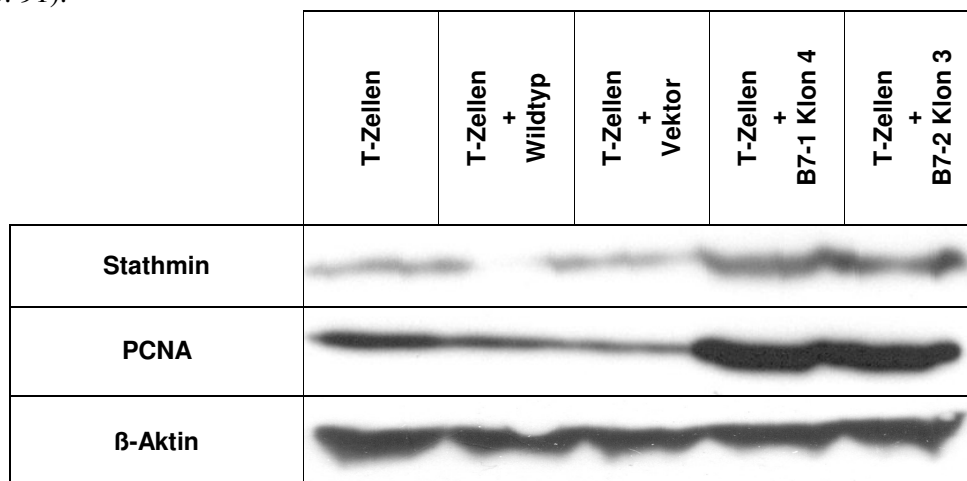


Abb. 91 Western Blot Analysen zur Evaluierung von Proteinspots der T-Zell Proteomanalyse

OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden mit fixierten Tumorzellen für 48h inkubiert. Aus den T-Zellpellets wurden die Proteine isoliert und in Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen Stathmin, PCNA und β-Aktin untersucht.

4.3.3. Nudix Hydrolase nudt 5

Proteine die eine Nudixmotiv GX(5)EX(7)REUXEEXGU besitzen gehören zu den Nudix-hydrolasen. Sie katalysieren die Hydrolyse einer Vielfalt von Nucleosid-diphosphat Derivaten. Diese Hydrolase Nudt5 katalysiert die Hydrolyse von ADP-Ribose und ADP-Mannose (Yang et al., 2000).

In den T-Zell Proteomanalysen zeigte sich eine deutliche Herunterregulation der Nudt5 Proteinexpression (Anhang X. 4) und ebenfalls eine reduzierte RNA Expression (Abb.92) bei Stimulierung mit B7-1 Klon 4.

4.3.4. Transaldolase 1

Die Transaldolase 1 ist das Schlüsselenzym des Pentose-Phosphat-Weges der die Zelle mit Reduktionsäquivalenten versorgt (Banki et al., 1994). Der Defekt dieses Gens führt zu einer starken Anhäufung von Pentosen im menschlichen Körper, was zu verschiedenen Krankheitsbilder wie z.B. der Hepatosplenomegalie und Leberzirrhose führt (Verhoeven et al., 2001).

In den T-Zell Proteomanalysen zeigte sich eine deutliche Herunterregulation der Transaldolase 1 Proteinexpression (Anhang X. 4) und ebenfalls eine reduzierte RNA Expression (Abb.92) bei Stimulierung mit B7-1 Klon 4.

4.3.5. Neuropeptid h3 – raf Kinase Inhibitor

Ursprünglich als hippocampales cholinerges neurostimulierendes Peptid (HCNP) im Gehirn identifiziert, zeigt Neuropeptid h3 eine gute Bindung von ATP und Phosphatidylethanolamin und funktioniert als Serinproteaseinhibitor (Hori et al., 1994). Neuropeptid h3 bindet weiter hin an raf und inhibiert dessen Funktion. Erst nach Aktivierung der PKC kann Neuropeptid h3 von raf abdissoziieren und die Signalkaskade ablaufen (Banfield et al., 1998; Yeung et al., 1999; Corbit et al., 2003).

Die Expression des Neuropeptids h3 war nach Stimulation der T-Zellen mit B7 transfizierten Tumorzellen deutlich reduziert auf Protein- (Anhang X. 4) und RNA-Ebene (Abb. 92). Zusätzlich wurde das Neuropeptid h3 nach Stimulation mit B7 auch phosphoryliert (Anhang X. 5).

4.3.6. PDGF Bindeprotein

Das PDGF Bindeprotein verstärkt den Effekt von PDGFa bei der Stimulation des Zellwachstums und inhibiert den mitogenen Effekt von PDGFb (Fischer und Schubert, 1996).

In den T-Zell Proteomanalysen war das PDGF Bindeprotein nach Stimulation mit B7 transfizierten Tumorzellen nicht mehr nachweisbar (Anhang X. 4) und in RT-PCR Analysen war die RNA Menge in diesen Proben deutlich reduziert (Abb. 92).

4.3.7. Proteinnetzwerke

Durch den Einsatz des neuentwickelten Text mining Programms TopNet des Fraunhofer Instituts für Bioinformatik konnten, auf der Basis der Medline Abstracts, Netzwerke von Beziehungen zwischen verschiedenen der identifizierten Proteine hergestellt werden. Das erstellte Netzwerk (Abb. 93) zeigt hier Zusammenhänge zwischen den Proteinen Stathmin (STMN1), GSTPi (GSTP1), RNA bindende Untereinheit (PARK7), PCNA, SMT3A (SMT3H1) und Apolipoprotein A1 (APOA1). Diese Verbindungen wurden hergestellt über die Proteine MAPKinasen (MAPK10), TGFβ (TGFB1), Prolaktin (PRL), Amyloid beta (APP) und Cyclin D1 (CCND1). Direkte Interaktionen zwischen identifizierten Proteinen konnten nicht gezeigt werden.

VI. Diskussion

Die Therapie des metastasierenden Nierenzellkarzinoms führt zur Zeit nur selten zum gewünschten Erfolg. Chemotherapeutika und systemische Immuntherapie zeigen in unter 30% der Fälle eine partielle Remission und in weniger als 10% der Erkrankungsfälle eine komplette Remission, so dass die durchschnittliche 5-Jahres Überlebensrate immer noch unter 10% liegt (Amato, 2000; Motzer und Russo, 2000; Brinkmann et al., 2002; Daliani et al., 2002; Krebs in Deutschland, 2002; Mejean et al., 2003; Zisman et al., 2003).

Die spezifische zelluläre Immuntherapie, die spezifische Immunantworten der Patienten aktivieren und so eine effektive und lang anhaltende Immunität gegen Tumorzellen vermitteln kann, versucht hier neue Wege aufzuzeigen (Abken et al., 2002; Kaech et al., 2002; Sullenger und Gilboa, 2002). Da vielen Tumorzellen eine Expression von costimulatorischen Molekülen wie B7 fehlt, ist die Expression von B7 Molekülen ein möglicher Weg, die Immunogenität von Tumorzellen zu erhöhen (Jung et al., 1999). Das Nierenzellkarzinom ist u.a. aufgrund einer guten HLA-Oberflächenexpression und Tumorantigenpräsentation (Motzer et al., 1996; Motzer und Russo, 2000; Renkvist et al., 2001) ein immunogener Tumor, der ein erstes spezifisches Signal in antigenspezifischen T-Zellen auslösen kann. Somit erscheint die Transfektion von B7-1 bzw. B7-2 in Nierenkarzinomzelllinien zur Costimulation von spezifischen T-Zellen und Vermittlung des zweiten aktivierenden Signals ein erfolgversprechender Ansatz zur Immuntherapie des metastasierenden Nierenzellkarzinoms.

1. Costimulation über B7/CD28/CTLA-4

Die beiden B7 Moleküle, B7-1 und B7-2, spielen zusammen mit ihren Rezeptoren CD28 und CTLA-4 eine entscheidende Rolle bei der Induktion von T-Zell Immunantworten. In einer Reihe von verschiedenen knockout Mäusen zeigte sich, dass die B7 Costimulation wichtig ist für die T-Zell Aktivierung, Generierung von IgG1 und IgG2a Antikörpern, Keimzellformierung in der Milz, Negativselektion im Thymus und Entstehung von Autoimmunreaktionen (Borriello et al., 1997; Chang et al., 1999; Mandelbrot et al., 2001; Buhlmann et al., 2003). Viel diskutiert werden Unterschiede zwischen der Funktion von B7-1 und B7-2. Entdeckt wurde B7-2 im Rahmen von Untersuchungen an einer B7-1 knockout Maus, weil trotz des Fehlens von B7-1 die Costimulation über CD28 möglich war (Freeman et al., 1993a; Freeman et al., 1993b). Auch bei anderen Untersuchungen zeigten B7-1 und B7-2 gleiche Funktionen (Hathcock et al., 1994; Borriello et al., 1997; Santra et al., 2000). Bessere costimulatorische Eigenschaften wurden für B7-1 in verschiedenen Tumormodellen beschrieben (Matulonis et al., 1996; Fields et al., 1998), während in dieser Arbeit bei vergleichbarer Molekülzahl B7-2 ein höheres Potential zur T-Zell Aktivierung als B7-1 zeigte (Abb. 43, siehe V1.1.). Da bei sehr hoher B7-2 Expression auf der Zelloberfläche die costimulatorischen Eigenschaften aber revertieren, scheint die Molekülzahl bzw. die Dichte an B7 Molekülen auf der Zelloberfläche von entscheidender Bedeutung zu sein. Auch in den Proteomanalysen dieser Arbeit zeigten sich Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zwischen B7-1 bzw. B7-2 stimulierten T-Zellen (V.4.). Diese Differenzen zwischen B7-1 und B7-2 belegen die Notwendigkeit, bei einem klinischen Einsatz B7-1 und B7-2 exprimierende zelluläre Vakzine in ihrer Funktion zu vergleichen.

2. Optimierung des zellulären B7 Vakzins *in vitro*

Parallel zu den Arbeiten zur Umsetzung einer klinische Studie wurden *in vitro* verschiedene Klone der B7-1 bzw. B7-2 transfizierten Nierenkarzinomzelllinie MZ1257RC eingehend auf ihr Aktivierungspotential HLA-gematchter und -ungematchter T-Zellen hin untersucht. Die Klone unterschieden sich in der Menge ihrer B7-Oberflächenmoleküle (Abb. 27, 28), hatten aber nur geringe Unterschiede in ihrer HLA-Oberflächenexpression (Abb. 26). Durch Quantifizierung der B7-Oberflächenmoleküle (Abb. 29, 30) war es möglich, in nachfolgenden

MLTC-Versuchen mit T-Zellen die stimulierenden Eigenschaften von B7-1 und B7-2 objektiv zu vergleichen. Die Zelllinien MZ1257RC B7-1 Klon 4 und MZ1257RC B7-2 Klon 3 exprimierten beide ca. 1,25 Mio. B7-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, während der Klon mit der stärksten B7-2 Expression ca. 2,4 Mio. B7 Oberflächenmoleküle besaß.

Die B7 transfizierten Zellen zeigten in MLTC Versuchen mit HLA-A2⁺ T-Zellen gute stimulierende Eigenschaften. Naive und auch OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden aktiviert und zeigten eine signifikante Proliferation (Abb. 34-37) und Zytokinsekretion.

Naive T-Zellen produzierten dabei vor allem IL-2 und IFN γ (Abb. 41), während vorstimulierte T-Zellen eine starke Sekretion von IFN γ und GM-CSF und eine etwas schwächere Sekretion von IL-10 und TNF α zeigten (Abb. 42, 43).

Mit zunehmender Menge an B7-1 Molekülen auf der Zelloberfläche der Tumorzellen stieg auch die Proliferation und Zytokinsekretion der aktivierten T-Zellen. Dies galt auch für die Stimulation mit den B7-2 exprimierenden Klonen 1, 2 und 3. Eine Stimulation mit Klon 4, der die stärkste B7-2 Oberflächenexpression zeigte, führte jedoch zu einer Verminderung der T-Zell Stimulation. Dieser überraschende Befund ist für einen klinischen Einsatz von großem Interesse, denn es konnte so erstmals gezeigt werden, dass eine zu starke Stimulation mit B7-2 zu einer erheblich schlechteren T-Zell Aktivierung führt.

Bei gemeinsamer Darstellung der T-Zell Stimulationen mit B7-1 bzw. B7-2 transfizierten allogenen Tumorzellen zeigten die Proliferationsdaten keine Unterschiede zwischen einer Stimulation mit B7-1 bzw. B7-2 (Abb. 37).

Durch Blockade mit HLA- und B7-Antikörpern (Abb. 38, 39) wurde die Proliferation der T-Zellen Dosis-abhängig inhibiert. Diese zeigte deutlich die Abhängigkeit der T-Zell Aktivierung von der HLA und B7 Expression. Durch T-Zell Stimulationen mit Mischungen von B7-1 Klon 4, B7-2 Klon 3 und Vektorkontrollzellen konnte ebenfalls die Abhängigkeit der T-Zell Proliferation von der B7-Expression gezeigt werden (Abb. 40).

Die Betrachtung der Zytokinsekretion zeigte deutliche Unterschiede in den Expressionsmustern zwischen der Costimulation mit B7-1 und B7-2. Während die Sekretion von IFN γ und GM-CSF bei HLA-A2⁺ ungematchten T-Zellen unabhängig davon war, ob B7-1 oder B7-2 transfizierte Tumorzellen zur Stimulation eingesetzt wurden (Abb. 43 links), war die Sekretion von TNF α und IL-10 bei ungematchten T-Zellen und die komplette Zytokinsekretion der HLA-gematchten T-Zellen hingegen wesentlich stärker, wenn die T-Zellen mit B7-2 Transfektanden stimuliert wurden (Abb. 43). Besonders auffällig war der große Unterschied in der Stimulation zwischen B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3, die eine vergleichbare Menge an B7 Oberflächenmolekülen exprimierten. Diese Ergebnisse stimmten mit vorhergehenden Untersuchungen überein, die B7-1 zwar eine hohe Signifikanz für das Andauern und die Modulation einer Immunantwort bescheinigten, in welchen B7-2 aber das insgesamt höhere Potential zur Induktion einer CD8⁺ T-Zell Antwort besaß (Matulonis et al., 1996; Salomon et al., 2000). Dem gegenüber stehen Publikationen die den Hauptunterschied in der Funktion von B7-1 und B7-2 in ihrer unterschiedlichen Expression auf den antigenpräsentierenden Zellen sehen (Sharpe und Freeman, 2002).

Die Zytokinsekretion stimulierter T-Zellen war wie die Proliferation direkt abhängig von der HLA bzw. B7 Expression der Tumorzellen, was sich durch die Inhibition der T-Zell Aktivierung mit HLA und B7 Antikörpern deutlich zeigen lies (Abb. 44). Durch Blockade mit CTLA-4 Ig konnten weiterhin die unterschiedlichen Bindeeigenschaften von B7-1 und B7-2 gezeigt werden. Die Blockade der B7-1 Stimulation war aufgrund der höheren Affinität für CTLA-4 wesentlich effektiver, als die Blockade der B7-2 Stimulation (Abb. 45).

Weiterhin war die Etablierung von zytotoxischen T-Zellen möglich, was zum einen die funktionelle Differenzierung der stimulierten T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen zeigte und zum anderen die Eignung des zellulären Vakzins für den klinischen Ansatz unterstrich (Abb. 46).

Die unterschiedlichen Muster in der Zytokinsekretion zwischen T-Zellen, die mit B7-1 bzw. B7-2 stimuliert wurden, deuten auf Unterschiede in den costimulatorischen Eigenschaften der beiden B7 Moleküle hin. B7-2 bindet schwächer an CD28 als B7-1, trotzdem scheint dies zu genügen, um ein vergleichbares CD28 Signal auslösen zu können (Davis et al., 2003). Die stärkere Bindung von B7-1 an CD28 ist nicht in der Lage, auch ein stärkeres positives Signal zu vermitteln. Diese gleiche Fähigkeit zur Aktivierung der T-Zell Proliferation von B7-1 und B7-2 wurde in den vergleichenden Proliferationsanalysen dieser Arbeit deutlich (Abb. 37).

Ein entscheidender Unterschied zwischen B7-1 und B7-2 zeigte sich bei der Zytokinsekretion vor allem durch die Bindung an CTLA-4 und dem damit verbundenen negativen Signal. Während jedes einzelne CD28 Molekül in der Lage ist, ein eigenständiges Signal zu vermitteln, funktioniert der negativ regulatorische Effekt von CTLA-4 nur bei starker Akkumulation vieler CTLA-4 Moleküle (Lee et al., 1998; Egen und Allison, 2002; Egen et al., 2002; Greenwald et al., 2002; Schwartz et al., 2002). Eine solche starke Anhäufung von CTLA-4 Molekülen im Bereich der immunologischen Synapse kann B7-2 nur in hoher Molekülzahl (B7-2 Klon 4) vermitteln, während B7-1 durch seine 13fach höhere Affinität für CTLA-4 gegenüber B7-2 schon viel früher eine negative Regulation ausübt (Davis et al., 2003). Dieser Effekt wird durch eine unterschiedliche Expression der beiden Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen noch verstärkt (Sharpe und Freeman, 2002). Auf den proliferativen Effekt der B7-Costimulation scheint die CTLA-4 Bindung dagegen keinen Einfluss zu haben.

Der unterschiedliche Einfluss von B7-1 und B7-2 auf die Sekretion von IFN γ und GM-CSF zeigte sich nur bei der Verwendung von HLA-gematchten T-Zellen, da bei einer Stimulation ungematchter T-Zellen ein stärkeres erstes Signal über den TZR, den negativ regulatorischen Effekt der B7-1 Bindung an CTLA-4 überlagert.

Dies deutet zum einen auf unterschiedliche Signalwege zur Regulation der IFN γ , GM-CSF Sekretion gegenüber der TNF α , IL-10 Sekretion hin aber auch auf unterschiedliche Wege die vom TZR bzw. CD28 ausgelöst werden (Alegre et al., 2001; Leo und Schraven, 2001). Diese Unterschiede könnten z.B. durch die Phosphorylierungen der regulatorischen Moleküle ran, rho GDI, Stathmin, Initiationsfaktor 5a, Spliceaktor p32 oder Neuropolypeptid h3, die in den Proteomanalysen dieser Arbeit gefunden wurden (Anhang X. 5.), vermittelt werden.

Die T-Zell Stimulierungsversuche zeigten das hohe immunstimulierende Potential der B7 Transfektanten. Die Zelllinien B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 können als effiziente Vakzine betrachtet werden, wobei B7-2 Klon 3 das etwas höhere Potential besitzt. Ein Vergleich der B7 Oberflächenexpression der Klone mit denen der ursprünglichen, unklonierten Kulturen für den klinischen Einsatz (Abb. 37, 38, 48) zeigt, dass die ursprüngliche, unklonierte B7-1 Kultur eine mit B7-1 Klon 4 vergleichbare B7-Expression besitzt. Die B7-Expression der ursprünglichen, unklonierten B7-2 Kultur liegt im Bereich zwischen B7-2 Klon 3 und Klon 4. Hier besteht daher das Risiko, dass die B7-2 Oberflächenexpression so hoch sein könnte, dass dies zu einer reduzierten T-Zell Aktivierung führen kann. Dieser Aspekt ist bei der Bewertung der Ergebnisse aus der klinischen Studie in Zukunft zu berücksichtigen.

3. Klinische Studie – Einsatz des B7-Vakzins *in vivo*

Zur Umsetzung der Vakzinierung mit B7 transfizierten Tumorzellen im Rahmen einer klinischen Pilotstudie wurde die etablierte humane Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257RC mit der humanen cDNA für B7-1 bzw. B7-2 transfiziert (Jung et al., 1999) und zur Produktion des zellulären Vakzins der Fa. Q-One Biotech, Glasgow, Schottland übersandt. Kryokonserven der beiden von der Fa. Q-One Biotech nach GLP-Prüfung unter GMP-Richtlinien hergestellten zellulären Vakzine MZ1257RC B7-1 und MZ1257RC B7-2 konnten erfolgreich wieder in Kultur genommen werden. Die Zellen zeigten die erwartete gute Expression der HLA und B7 Oberflächenmoleküle (Abb. 48), der Tumorantigene p53, mdm2 und Her2/neu (Abb. 49) und der costimulatorischen Moleküle ICAM-1, LFA-3 und CD40 (Abb. 50). Somit stehen diese Zellen für eine klinische Anwendung zur Verfügung.

Für den klinischen Einsatz der beiden Vakzine MZ1257RC B7-1 und B7-2 wurde eine SOP für den Ablauf Auftauen – Bestrahlung – Verabreichung etabliert (Anhang X. 3.). In der SOP finden nur Geräte, Materialien und Medien Anwendung, die sich schon im klinischen Einsatz des Tumorstammzelllabors, des Stammzelllabors und der Blutbank der Uniklinik Mainz befinden. Somit sind hier keine zusätzlichen Genehmigungen für eine Verwendung unter GMP Richtlinien notwendig.

Für die letale Bestrahlung des zellulären Vakzins innerhalb des Ablaufsprotokolls der SOP konnte eine Strahlendosis von 180Gy als optimal ermittelt werden. Dieser Wert deckt sich gut mit Literaturangaben, wo Bestrahlungsdosen zwischen 150Gy und 200Gy als effektiv für eine Tumorzellinaktivierung berichtet wurden (Galligioni et al., 1996; Simons et al., 1997; Nelson et al., 2000). Im Gegensatz dazu müssen Literaturwerte, die zwischen 25Gy und 40Gy liegen (Plautz et al., 1999; Seigne et al., 1999; Li et al., 2000; Kusumoto et al., 2001), aufgrund der vorliegenden Ergebnisse (Abb. 52, 53), als zu niedrig für den klinischen Einsatz der Nierenkarzinomzelllinie MZ1257RC betrachtet werden. Da zum Schutz der Patienten keine teilungsfähigen Zellen verabreicht werden dürfen (Patientencharta, 1999; Patientenrechte in Deutschland, 2003), liegt die Dosis von 180Gy etwas höher, als die für Laborversuche mit Nierenkarzinomzelllinien in der Arbeitsgruppe eingesetzte Dosis von 100Gy (Abb. 55, 56; Bukur, persönliche Mitteilung).

Nach dem Durchlauf der SOP mit der Bestrahlungsdosis von 180Gy hatten die Zellen ihre HLA und B7 Oberflächenexpression (Abb. 51) und immunstimulierenden Eigenschaften nicht verloren (Abb. 57). Die SOP ist somit für den klinischen Einsatz geeignet, einem hohen Schutz für den Patienten steht eine gute immunstimulierende Wirkung gegenüber.

Der klinische Einsatz von allogenen B7 transfizierten Tumorstammzellvakzinen ist einer von vielen Therapieansätzen im Bereich der Immuntherapie, die klinisch überprüft werden (Pohla et al., 2000; Schendel et al., 2000).

Diese Studien stehen in Konkurrenz zu verschiedenen anderen immuntherapeutischen Ansätzen, wie dem Einsatz von autologen dendritischen Zellen gepulst mit Tumorstammzelllysat (Märten et al., 2002; Oosterwijk-Wakka et al., 2002; Schuler et al., 2003), autologen Tumorstammzellen mit unspezifischen Adjuvantien (Galligioni et al., 1996; Plautz et al., 1999; Li et al., 2000; Chang et al., 2003; Liang et al., 2003), autologen Tumorstammzellen transfiziert mit GM-CSF (Simons et al., 1997; Seigne et al., 1999; Nelson et al., 2000; Tani et al., 2000; Kusumoto et al., 2001; Salgia et al., 2003), Zellfusionen aus Tumorstammzellen und dendritischen Zellen (Kugler et al., 2000; Avigan, 2003) und der allogenen Stammzelltransplantation (Childs und Srinivasan, 2002; Childs, 2002; Drachenberg und Childs, 2003; Hentschke et al., 2003).

In allen diesen Studien werden die Zellen letal bestrahlt oder fixiert, um eine Zellteilung und damit die Gefahr von Metastasen zu verhindern. Zur Zeit wird in den USA über den Einsatz von unbestrahlten autologen Vakzinen diskutiert, weil man durch eine längere Verweildauer

des Vakzins am Ort der Verabreichung eine bessere Immunstimulation erwartet (Blankenstein 2002, persönliche Mitteilung). Bei einer Abwägung zwischen Nutzen und Risiko soll hier der therapeutische Nutzen für Patienten größer sein als das Risiko zusätzlicher Metastasen. Die Ergebnisse dieser Ansätze bleiben abzuwarten.

4. Autologes B7 Vakzin mit Retroviren

Der klinische Einsatz von autologen zellulären B7 Vakzinen hat gegenüber allogenen Vakzinen einige Vorteile, die vor allem die optimale Antigenpräsentation betreffen. Autologe Vakzine tragen alle Tumorantigene, die auch die Tumorzellen besitzen, und sie können sie über alle HLA-Moleküle präsentieren. Außerdem ist bei autologen Vakzinen, die mittels Retroviren transfiziert werden, die Verwendung von Antibiotikaresistenzen nicht notwendig.

Allogene Vakzine dagegen sind nur in der Lage Immunreaktionen auslösen, wenn sie die gleichen Antigene besitzen wie die Tumorzellen des aktuellen Patienten. Außerdem steht einem allogenen Vakzin nur die Präsentation über die HLA-A2 bzw. andere gemeinsame HLA Moleküle zur Stimulierung antigenspezifischer T-Zellen zur Verfügung.

Der Vorteil der allogenen Vakzine liegt dagegen in ihrer sofortigen Verfügbarkeit und hohen Sicherheit für den Patienten, da es aufgrund der unterschiedlichen HLA-Oberflächenmoleküle zu einer schnellen Abstoßungsreaktion kommt. Außerdem besteht hier im Vergleich zum Einsatz von Retroviren keinerlei Gefahr einer leukämieähnlichen Erkrankung (Tab. 15, Abb. 58).

Tab. 15 Eigenschaften von autologen und allogenen Vakzinen für Patient MZ2003RC

		Vakzine	
		autolog MZ2003RC	allogen MZ1257RC
Sicherheit	durch Bestrahlung	++	++
	durch Abstoßung	–	++
Einsetzbarkeit		+ 6 Monate nach OP	++ sofort
Immunstimulation	Antigen	++ alle Antigene	+ gemeinsame Antigene
	Präsentation	++ alle HLA Moleküle	+ nur HLA-A2
	Costimulation	++ B7-1 oder B7-2	++ B7-1 oder B7-2
unspezifische Stimulation durch Antibiotikaresistenzen		–	möglich
Risiko einer Leukämie ähnlichen Erkrankung		möglich ?	– –

Die Etablierung eines B7 retroviralen Transfektionssystems ist neben der Verbesserung der Etablierung von Tumorzelllinien aus OP-Material ein entscheidender Punkt für die Herstellung eines autologen Vakzins.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die humane cDNA von B7-1 bzw. B7-2 in ein retrovirales Transfektionssystem mit sehr geringer Immunogenität durch die GR-leader Sequenz (Hildinger et al., 1999) und guter Transfektionseffizienz in Nierenkarzinomzellen durch die LTR des SFFV (Tab. 7) eingebracht werden. LTR Bereiche des MPSV und MoMuLV eignen sich nicht zur Transfektion von Nierenkarzinomzelllinien (Abb. 60).

Die hergestellten retroviralen Kulturüberstände zeigten eine gute Transfektionseffizienz (Abb. 61), obwohl hier auf verschiedene Optimierungsmöglichkeiten, wie z.B. Vorcoaten der Kulturschalen mit Retroviren (Kühlcke et al., 2002) oder dem Einsatz von Fibronectinfragmenten (Trarbach et al., 2000; Zhou et al., 2001; Lamers et al., 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2003), verzichtet wurde. Die Nierenkarzinomzelllinien MZ1257RC und MZ2733RC konnten transfiguriert und Klone von B7 exprimierenden Zellen etabliert werden, auch ohne die Möglichkeit Selektionsdruck ausüben zu können (Tab. 9).

Allerdings gelang nicht, Zelllinien zu etablieren, die B7-1 und B7-2 gemeinsam auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die Transfektanten zeigten nur eine stabile Expression von B7-1 (Abb. 61, Tab. 8). Dies lässt sich am besten durch die Verwendung unterschiedlicher IRES-sites erklären. Während die IRES-site des Encephalomyocarditis Virus in den plasmidbasierten Vektoren sehr gut funktionierte, wurde in den retroviralen Vektoren die IRES-site des NF- κ B *repressing factor* (NRF) verwendet, die offensichtlich in den vorliegenden Zelllinien nicht effektiv funktionierte.

In MLTC Analysen zeigten die retroviralen B7 Transfektanten gute T-Zell stimulatorische Eigenschaften. Die T-Zellen wurden sowohl zur Proliferation als auch zur Zytokinsekretion angeregt. (Abb. 62), wenn auch die Ergebnisse, die beim Einsatz der B7-Plasmid transfigurierten Zellen erreicht wurden, unterschritten wurden.

Somit steht zur Herstellung eines autologen zellulären B7 Vakzins ein effektives Transfektionssystem für den klinischen Einsatz zur Verfügung. Durch die Verbesserung der Etablierung von Nierenkarzinomzelllinien (Bukur, persönliche Mitteilung) könnte ca. 6 Monate nach OP für knapp 50% der Patienten ein autologes Vakzin neben dem vorhanden allogenen Vakzin zur Verfügung stehen (Abb. 58).

Im Laufe dieser Arbeit stellten sich einige gravierende Nebenwirkungen bei Patienten ein, die eine Gentherapie mit Retroviren in Frankreich erhalten hatten. Beim Einsatz replikationsdefizienter, gering immunogener Vektorsysteme zur Therapie einer Immunschwäche erkrankten zwei Kinder nach Transfektion ihrer Knochenmarkstammzellen an Leukämie (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Dies bestätigte Ergebnisse, die kurz vorher in Mausmodellen gezeigt wurden (Li et al., 2002). Daraufhin wurden in Deutschland alle klinischen Studien mit Retroviren gestoppt. Die meisten Studien, die Retroviren nicht zur Transfektion von Knochenmarkstammzellen oder anderen Zellen des Immunsystems einsetzen, konnten nach leichten Modifikationen im klinischen Protokoll fortgesetzt werden (Paul-Ehrlich-Institut und Bundesärztekammer, 2003).

Der SFFV ist in der Lage, Leukämie bei Mäusen und Menschen auszulösen (Chretien et al., 1994; Muszynski et al., 2000; Afrikanova et al., 2002). Dies wird unter anderem durch die Integration des Provirus in den Promotorbereich des Gens für Erythropoetin bzw. des Transkriptionsfaktors PU.1 vermittelt. Man muss daher davon ausgehen, dass die LTR des SFFV und damit auch die hier vorliegenden Vektorsysteme potentiell in der Lage sind, in Knochenmarkstammzellen bzw. den Zellen des Immunsystems Leukämie auszulösen. In wie weit dies einen Einfluss auf einen möglichen klinischen Einsatz bei Nierenkarzinomzelllinien hat, kann man jetzt noch nicht abschätzen. Es bedarf zunächst einer sorgfältigen Risikoabwägung (Baum et al., 2003). Da es sich hier aber erstens um einen anderen Zelltyp handelt und zweitens das zelluläre Vakzin vor seinem klinischen Einsatz sicher inaktiviert wird, sollte hier die Bundesärztekammer keinen Grund sehen, einen klinischen Einsatz abzulehnen.

5. Verbesserte T-Zell Aktivierung durch ein anti CTLA-4 Ribozym

Die genetische Modifikation von T-Zellen ist ein wichtiger Ansatz zur Untersuchung der normalen T-Zell Funktion und zur Verbesserung der antitumoralen Aktivität (Sadelain et al., 2003). Es gibt verschiedenste Ansätze, die antitumoralen Eigenschaften von T-Zellen genetisch zu verändern. Dazu zählen zum einen die Verbesserung der Antigenerkennung durch Transfektion von rekombinanten T-Zell Rezeptoren gegen z.B. mdm2 (Stanislawski et al., 2001), G250 (Weijtens et al., 2000), HER2/neu (Haynes et al., 2002) oder chimären Rezeptoren mit CD3 und CD28 Signaldomäne (Hombach et al., 2001).

Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, die costimulatorische Stimulierung, z.B. durch Inhibition der Expression negativer Rezeptoren wie CTLA-4, PD-1 oder PD-2 oder Blockade ihrer Signalwege zu verbessern (van Elsas et al., 2001; Egen und Allison, 2002; Espenschied et al., 2003; Hurwitz et al., 2003; Najafian und Khoury, 2003).

Als Methoden, mit denen man diese Inhibition erreichen kann, stehen z.B. Blockade mit Antikörpern oder Inaktivierung der mRNA durch antisense Oligonukleotide (Lin et al., 2000; Dreikhausen et al., 2003; Widney et al., 2003), siRNA (McManus et al., 2002; Hill et al., 2003) oder Ribozyme (Akkina et al., 2003; Li et al., 2003b; Poluri et al., 2003) zur Verfügung. Für den Einsatz bei T-Zellen werden dabei zumeist Systeme bevorzugt, bei denen die Expression der inhibitorischen Moleküle stabil erfolgt (Akkina et al., 2003; Li et al., 2003b; Poluri et al., 2003). Die direkte Transfektion mit siRNA Molekülen für einen transienten Einsatz funktioniert meist nur mit etablierten Zelllinien (McManus et al., 2002; Hill et al., 2003). Der Einsatz von Ribozymen gerichtet gegen die HIV-1 mRNA ist bereits in der klinischen Anwendung (Wong-Staal et al., 1998a), langfristige Ergebnisse liegen allerdings noch nicht vor. Basierend auf einem bekannten funktionellen CTLA-4 Ribozym (Cepero et al., 1998) wurde eine Transkriptionskassette für die RNA-Polymerase III (tRNA Valin) mit diesem Ribozym hergestellt. Für einen möglichen klinischen Einsatz konnte dieses DNA-Konstrukt in ein vorliegendes retrovirales Expressionssystem (Hildinger et al., 1999) integriert werden (Abb. 67). Die direkte Herstellung retroviraler Kulturüberstände analog zur Herstellung der B7-Retroviren musste aufgrund der aktuellen Entwicklungen (Baum et al., 2003; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Paul-Ehrlich-Institut und Bundesärztekammer, 2003) allerdings zurückgestellt werden.

Somit musste die Funktion des CTLA-4 Ribozym Konstruktes in einem eigenen System getestet werden. Durch Klonierung eines Expressionsvektors für humanes CTLA-4 (Abb. 63) und anschließende Transfektion gelang die Expression von humanen CTLA-4 in der Zelllinie COS7. Typisch für CTLA-4 zeigte sich nur eine geringe Oberflächenexpression (Alegre et al., 2001; Egen et al., 2002; Schwartz et al., 2002; Davis et al., 2003), während verschiedene Zellklone in den intrazellulären FACS Analysen eine sehr gute intrazelluläre CTLA-4 Expression zeigten (Abb. 64).

Diese Expression konnte durch die Transfektion mit Plasmiden, die das CTLA-4 Ribozym Expressionskonstrukt in verschiedenen Orientierungen trugen (Abb. 65), reduziert werden. Dabei spielte die Richtung, in der das Expressionskonstrukt im retroviralen System integriert war, keine entscheidende Rolle (Abb. 66).

Durch keines der beiden Expressionskonstrukte konnte die Oberflächenexpression verhindert werden. Dies entspricht den Ergebnissen der ursprünglichen Arbeit (Cepero et al., 1998), und ist auch durchaus erwünscht, da die Funktion von CTLA-4 immer noch kontrovers diskutiert wird. Immer wieder werden auch positive Eigenschaften von CTLA-4 berichtet (Bai et al., 2002), die den Blockadeansätzen mit anti CTLA-4 Antikörpern entgegen stehen (van Elsas et al., 2001; Egen und Allison, 2002; Egen et al., 2002; Espenschied et al., 2003; Hurwitz et al., 2003; Najafian und Khoury, 2003). Eine geringe CTLA-4 Expression sollte vor allem bei der Initiation der Immunantwort von Vorteil sein. Nur eine starke Expression, wie z.B. nach einer T-Zell Aktivierung kann eine stark negative Wirkung ausüben (Alegre et al., 2001; Egen et al., 2002; Sharpe und Freeman, 2002).

Der Einsatz eines anti CTLA-4 Ribozym Expressionskonstruktes in peripheren T-Zellen und dessen Einfluss auf die T-Zell Aktivierung durch B7 transfizierte Tumorzellen kann grundlegende Erkenntnisse für das Verständnis der Immunologie und Verbesserung der experimentellen Immuntherapie bringen.

6. Costimulation durch B7 Homologe Moleküle

Durch die Identifikation verschiedener B7 Homologe wurde das Verständnis der Wechselwirkung zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen ständig verbessert (Yoshinaga et al., 1999; Freeman et al., 2000; Ling et al., 2000; Yoshinaga et al., 2000; Chapoval et al., 2001; Greenwald et al., 2002; Liang und Sha, 2002; Sharpe und Freeman, 2002).

Ebenso wie B7-1 und B7-2 haben die B7 homologen Moleküle B7-H2 und B7-H3 einen positiven costimulatorischen Effekt auf T-Zellen (Ling et al., 2000; Wang et al., 2000b; Khayyamian et al., 2002; Brown et al., 2003). B7-H1 hingegen vermittelt ein Apoptosesignal über den PD-1 Rezeptor auf den T-Zellen (Dong et al., 2002; Mazanet und Hughes, 2002).

Bis jetzt am besten charakterisiert ist B7-H2, der Ligand des induzierbaren Costimulators (ICOS). B7-H2 spielt vor allem eine wichtige Rolle bei der B- und CD4⁺ T-Zell Aktivierung durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (Hutloff et al., 1999; Yoshinaga et al., 2000; Greenwald et al., 2002; Liang und Sha, 2002). Eine Funktion in der CD8⁺ T-Zell Aktivierung wurde einmal beobachtet (Wallin et al., 2001).

Die Untersuchungen der professionellen antigenpräsentierenden Zellen in dieser Arbeit zeigten in allen Proben eine erwartete (Ling et al., 2000) gute RNA-Expression von B7-H2 (Abb. 68). Bei der Analyse der dendritischen Zellen zeigte sich eine stärkere Expression von B7-H2 in reifen dendritischen Zellen gegenüber unreifen Zellen. Dies widerspricht bisher publizierten Daten, bei denen in FACS Analysen LPS gereifter dendritischer Zellen keinerlei Oberflächenexpression von B7-H2 nachweisbar war (Wang et al., 2000b).

Die Western Blot Analyse zeigte sehr deutliche Banden in den Proteinproben der B7-H2 transfizierten Nierenkarzinomzelllinie MZ1257RC B7-H2, die hier als Positivkontrolle diente (Abb. 69). Die B7-H2 Proteinbanden zeigten sich bei der Positivkontrolle ohne Glycosidase F Behandlung bei ca. 65kDa und mit Behandlung bei 35kDa. Da dieses Bandenmuster schon publiziert wurde (Khayyamian et al., 2002), können auch die schwachen Banden der Proteingele der Proben der dendritischen Zellen als spezifisch betrachtet werden. Hier zeigte sich analog zu den RNA-Daten eine etwas stärkere B7-H2 Expression der reifen dendritischen Zellen. Die untersuchten professionellen antigenpräsentierenden Zellen zeigten auch eine gute Expression von B7-H2 in FACS-Analysen (Abb. 70).

Die Analyse verschiedener Nierenkarzinomzelllinien zeigte in allen Proben ebenfalls eine RNA-Expression von B7-H2. Die Stärke dieser Expression war sehr unterschiedlich zwischen den Zelllinien, ebenso wie die Veränderungen nach IFN γ Stimulation (Tab. 10). In Western Blot Analysen war kein signifikanter Nachweis von B7-H2 möglich. Auch die FACS Analysen zeigten nur eine sehr schlecht nachweisbare Oberflächenexpression auf verschiedenen Nierenkarzinomzelllinien. Im Vergleich zur ebenfalls nur schwach nachweisbaren Oberflächenexpression der EBV Zellen, muss man diese Daten so interpretieren, dass B7-H2 von Nierenkarzinomzelllinien exprimiert wird, wenn auch in nur sehr geringer Menge.

Die Untersuchung der Neuroblastomzelllinien zeigte bei drei der fünf Zelllinien keinerlei RNA Expression von B7-H2. Ein ähnlich heterogenes Bild zeigten die RT-PCR Analysen der Cervix-, Melanom- und HNSCC-Zelllinien. Wenigen Proben fehlt die Expression der B7-H2 RNA, bei zwei Zelllinien ist die RNA-Expression erst durch IFN γ induzierbar (Tab. 10).

Insgesamt zeigte sich ein sehr heterogenes Expressionsmuster, dass sich nur schlecht interpretieren lässt. Da mehreren Neuroblastomzelllinien aber die B7-H2 Expression komplett fehlt,

könnte dies bei diesen Tumoren auf einen neuen *tumor escape* Mechanismus hindeuten. Aufgrund der schwachen B7-H2 Oberflächenexpression der meisten Proben, kann diese B7-H2 Expression aber auch zu gering für eine funktionelle T-Zell Aktivierung sein.

Die Analyse verschiedener Gewebeproben von Nierentumoren, Kopf-Hals-Tumoren und korrespondierendem normalem Gewebe zeigte ein Expressionsmuster, das nach den vorangegangenen Analysen zu erwarten war (Tab. 11). Alle Tumorproben zeigten eine RNA-Expression von B7-H2, dies liegt hier mit Sicherheit auch an verschiedenen tumorinfiltrierenden PBMC. Auch die Normalgewebeproben waren zumeist B7-H2 RNA positiv. Dies deckt sich auch mit den wenigen bis jetzt publizierten Arbeiten, die B7-H2 RNA in verschiedenen Geweben wie Niere, Herz, Leber, Darm, und Thymus nachwiesen (Yoshinaga et al., 2000).

Die Expressionsanalysen zeigten deutlich, dass es zwar in vielen Zelltypen und Zellgeweben eine gute RNA-Expression von B7-H2 gibt, die Proteinexpression jedoch meist sehr gering ist. Da von B7-H2 eine gute T-Zell costimulatorische Aktivität bekannt war (Yoshinaga et al., 1999; Yoshinaga et al., 2000; Liu et al., 2001; Wallin et al., 2001; Khayyamian et al., 2002), schien es ein sehr vielversprechender Ansatz, B7-H2 in etablierte Nierenkarzinomzelllinien zu transfizieren. Daraus entstehende Zellen hätten in MLTC-Versuchen grundlegende Erkenntnisse über die B7-H2 ICOS Stimulierung aufdecken und evtl. auch als zelluläres Vakzin dienen können.

Die Klonierung der B7-H2 cDNA erwies sich schwieriger als erwartet, denn es traten relativ häufig Abweichungen von den in den Datenbanken abgelegten Sequenzen auf. In dieser Arbeit gelang nur die Klonierung und Expression einer B7-H2 Variante mit einem konservativen Aminosäureaustausch aus einer etablierten EBV-Zelllinie (Abb. 74). Verschiedene andere Varianten konnten partiell sequenziert, aber nicht in Nierenkarzinomzelllinien transfiziert werden. Darunter war auch eine Exon 3 Verlustvariante, die des öfteren als Nebenprodukt in verschiedenen PCR-Analysen zu beobachten war (Yoshinaga et al., 2000).

Die zur Transfektion eingesetzte B7-H2 Variante kann allerdings als funktionell betrachtet werden, da die transfizierten Tumorzelllinien eine signifikante Bindung an ein in dieser Arbeit hergestelltes ICOS-Ig Fusionsprotein (Abb. 77) zeigten.

In den MLTC Versuchen zeigten verschiedene B7-H2 Transfektanten in mehreren Ansätzen keinerlei costimulatorische Aktivierung peripherer T-Zellen (Abb. 79).

Diese Untersuchungen zeigen, dass der Einsatz von B7-H2 transfizierten Nierenkarzinomzelllinien als zelluläres Vakzin nicht sinnvoll ist. Dies steht im Widerspruch zu Publikationen, bei denen durch B7-H2 Costimulation eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen möglich war (Wallin et al., 2001).

Vielleicht lässt sich durch die Expression anderer Varianten, wie z.B. der Exon 3 Verlustvariante, noch eine positive T-Zell Costimulation auf Nierenkarzinomzelllinien erreichen. Ebenfalls bieten sich die B7-H2 negativen Neuroblastomzelllinien als Kandidaten für eine B7-H2 Transfektion und weitere eingehende grundlegende Untersuchungen an.

Bei der Untersuchung der B7-H3 Expression zeigten sich nur wenig signifikante Ergebnisse. B7-H3, dem eine positiv regulatorische Rolle bei der T-Zell Aktivierung zugeschrieben wird (Chapoval et al., 2001; Dong et al., 2003; Suh et al., 2003; Sun et al., 2003), zeigte eine konstitutive RNA-Expression in den untersuchten Tumorzelllinien (Abb. 83), die durch IFN γ nicht induzierbar war. Die professionellen antigenpräsentierenden Zellen zeigten nur eine geringe Expression bei PBMC und EBV B-Zellen, während Makrophagen und dendritische Zellen eine gute Expression der B7-H3 RNA zeigten (Abb. 82).

Da B7-H3 auch von der Zelllinie MZ1257RC exprimiert wird, sollte die B7-H3 Expression die Funktion des zellulären B7-Vakzins *in vivo* nicht beeinflussen.

Einen direkten Einfluss auf die Funktion des Vakzins könnte aber die Expression von B7-H1 haben. Zunächst wurde noch von einer positiven Rolle von B7-H1 bei der T-Zell Costimulation berichtet (Dong et al., 1999). Damals zeigte sich allerdings auch schon eine starke Expression von IL-10. Da dessen Funktion eher in der Regulation der Immunantwort liegt, statt in deren Aktivierung, war dies schon ein Indiz für negativ regulatorische Eigenschaften, die sich in späteren Untersuchungen bestätigten (Freeman et al., 2000; Dong et al., 2002; Greenwald et al., 2002; Liang und Sha, 2002; Mazanet und Hughes, 2002; Brown et al., 2003). B7-H1 vermittelt als Ligand *des programmed death receptor* PD-1 unter anderem Apoptose und andere negativ regulatorische Eigenschaften. Eine Blockade von B7-H1 verstärkt eine T-Zell Aktivierung (Brown et al., 2003), daher muss die B7-H1 Expression von Tumorzellen bei einer zellulären Vakzinierung beachtet werden.

In den RT-PCR RNA-Analysen zeigte sich eine gute B7-H1 Expression auf allen professionellen antigenpräsentierenden Zellen (Abb. 80) und eine durch IFN γ induzierbare Expression in vielen der Tumorzelllinien, vor allem bei den Nierenkarzinomzelllinien (Abb. 81). Somit wird durch IFN γ nicht nur die HLA-Expression (Seliger et al., 2000), sondern auch die Expression des negativen Costimulators B7-H1 verstärkt. Diese Ergebnisse könnten auch eine Erklärung für schlechte Ergebnisse bei der unspezifischen Immuntherapie mit IFN γ sein (Brinkmann et al., 2002).

7. Die optimale Therapie für RC-Patient MZ2003RC

Welches ist die optimale Therapie bzw. welche Therapiemöglichkeiten stehen für den Nierenkarzinompatienten, der im Jahr 2003 in Mainz an einem Nierenzellkarzinom erkrankt zur Verfügung (Abb. 94) ?

Kommt es vor oder nach erfolgreicher operativer Entfernung zu einer Metastasierung, so ist eine Chemotherapie wenig sinnvoll, da ihre Ansprechrate unter 10% liegt. Eine unspezifische Immuntherapie z.B. mit IL-2 oder IFN α verzeichnet immerhin in einigen Fällen eine teilweise und in wenigen Fällen eine komplette Heilung.

Da es sich beim Nierenkarzinomzellen um einen immunogenen Tumor handelt (Motzer et al., 1996; Motzer und Russo, 2000; Renkvist et al., 2001), kann man davon ausgehen, dass die Tumorzellen eine gute Antigenpräsentation besitzen und antigenspezifische T-Zellen im Körper der Patienten vorhanden sind. Für die spezifische Immuntherapie gibt es verschiedene Ansätze, von denen aber meist noch keine aussagekräftigen Ergebnisse aus klinischen Studien vorliegen.

Ist das Tumorantigen, welches die Tumorzellen besitzen bzw. präsentieren bekannt, besteht die Möglichkeit Peptid-, Protein- oder DNA-Vakzine herzustellen und zu verabreichen (Pardoll, 2002). Während Protein-Vakzine gut in der Lage sind, Antikörperantworten auszulösen, ist die Immunogenität gegenüber CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen bei diesen Vakzinen nur sehr schwach. Diese Vakzine sind darauf angewiesen, dass sie von dendritischen Zellen unspezifisch aufgenommen und präsentiert werden (Parkhurst et al., 1996; Asea et al., 2000; Castellino et al., 2000; Slansky et al., 2000; Wang et al., 2000a; Hung et al., 2001; Livingston et al., 2001; Parmiani et al., 2002). Da dieser Vorgang *in vivo* sehr ineffektiv ist, werden dendritische Zellen in anderen Studien *ex vivo* hergestellt und beladen. Dies ist vergleichsweise aufwendig, hat aber ein hohes immunogenes Potential (Nestle et al., 1998; Dyall et al., 2001; Lambert et al., 2001; You et al., 2001).

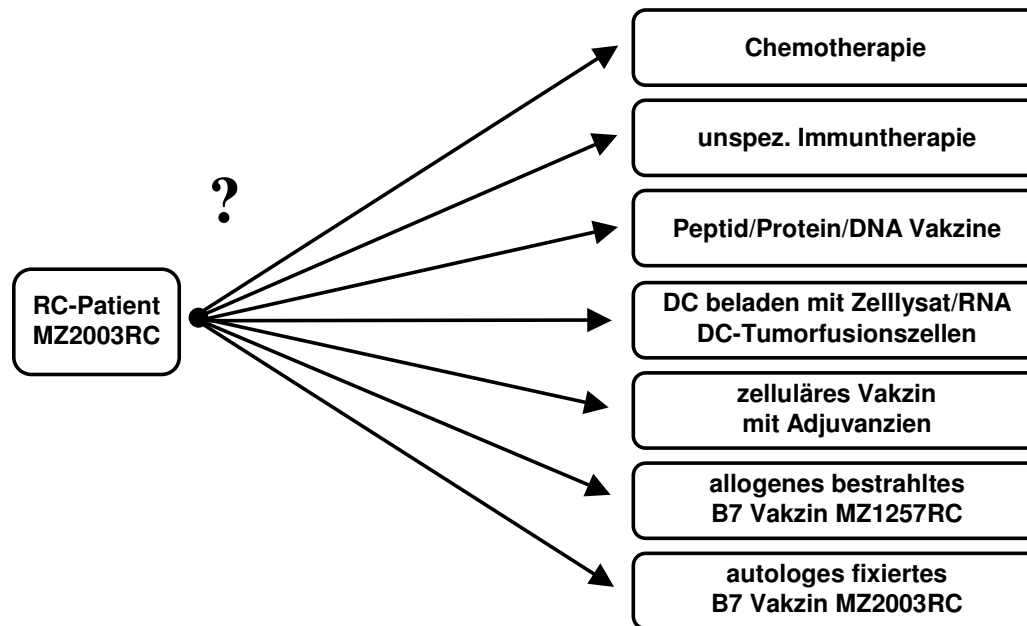


Abb. 94 Therapiemöglichkeiten für Patient MZ2003RC

Ein anderer Weg der Vakzinherstellung ist die *ex vivo* Beladung von dendritischen Zellen mit Tumorzelllysate, Tumor-RNA oder die DC-Tumorzellfusion. Diese Ansätze bieten zwar eine tumorspezifische Antigenpräsentation, sind aber in ihrer Durchführung noch problembehaftet. Bei einer Beladung mit Zelllysate kann es sehr leicht zu unspezifischen Immunreaktionen kommen. Außerdem ist die Beladung meist sehr ineffektiv, ebenso wie die Expression der aus Tumoren gewonnenen RNA (Thornburg et al., 2000; Heiser et al., 2001; Heiser et al., 2002; Sullenger und Gilboa, 2002). Daten, die aus Kurierversuchen mit DC-Tumorzellfusionen bekannt wurden, erschienen zunächst sehr vielversprechend. Da es aber bei der Ermittlung der klinischen Situation zu nicht nachvollziehbaren Auswertungen kam, ist der Wert dieser Daten allerdings zur Zeit nicht abschätzbar (Gong et al., 1997; Kugler et al., 2000; Avigan, 2003).

Als Alternative zum Einsatz von dendritischen Zellen bietet sich die Vakzinierung mit Tumorzellen an. Dabei wurde in den ersten klinischen Einsätzen vor allem der Einsatz von zusätzlichen unspezifischen Adjuvantien bevorzugt, was nur zu geringen Erfolgen führte (Galligioni et al., 1996; Simons et al., 1997; Plautz et al., 1999; Seigne et al., 1999; Li et al., 2000; Nelson et al., 2000; Tani et al., 2000; Kusumoto et al., 2001; Chang et al., 2003; Liang et al., 2003).

Der Einsatz von costimulatorischen Molekülen (wie z.B. B7) soll die spezifische Immunantwort unterstützen. Dies ist deshalb besonders erfolgsversprechend, da den meisten Tumorzellen eine Expression von B7 fehlt.

Nach Genehmigung der klinischen B7-Studie durch die Bundesärztekammer würde dem Patienten MZ2003RC das allogene bestrahlte B7 Vakzin MZ1257RC B7-1 bzw. B7-2 zur Verfügung stehen, einzige Voraussetzung ist dabei, dass der Patient HLA-A2⁺ ist. Durch dieses allogene Vakzin kann eine Immunantwort gegen die Antigene hervorgerufen werden, die zwischen MZ1257RC und MZ2003RC identisch sind und von MZ2003RC über HLA-A2 präsentiert werden. Eine Immunantwort sollte zu einer lang anhaltenden Immunogenität gegen diese Antigene führen.

Direkt nach bzw. noch während der OP werden entnommene Nierenkarzinomzellen bearbeitet und der Versuch gestartet, eine Nierenkarzinomzelllinie zu etablieren (Bukur, persönliche Mitteilungen). In zur Zeit knapp 50% der Fälle gelingt eine solche Etablierung. Durch anschließende Transfektion mit einem B7 Retrovirus würde ein autologes Vakzin MZ2003RC B7-1 bzw. B7-2 zur Verfügung stehen. Nach Inaktivierung der Zellen, könnte dem Patienten

bei Auftauchen der ersten Metastasen eine erfolgversprechende autologe Vakzinierung angeboten werden. Dieses Vakzin hätte neben den costimulatorischen Eigenschaften eine Antigenpräsentation, die vollständig mit der der Patiententumorzellen übereinstimmt. Hier kann sich eine lang anhaltende Immunogenität gegen alle vorhandenen Tumorantigene ausbilden (Abb. 94).

Die Fixierung mit Paraformaldehyd hat sich in dieser Arbeit als geeignet erwiesen, um Tumorzellen zu inaktivieren, ohne dass diese ihre T-Zell stimulierenden Eigenschaften verlieren. Somit steht diese Methode für den klinischen Einsatz als Alternative zur radioaktiven Bestrahlung zur Verfügung, so wie sie schon in verschiedenen anderen Studien eingesetzt wird (Matteucci et al., 2000; Liang et al., 2003). Bei den *in vitro* Untersuchungen ermöglichte die Verwendung dieser Methode auch den Einsatz verschiedener nichtradioaktiver Analysen wie MTS-Test oder BrdU ELISA, die mit bestrahlten Tumorzellen nicht möglich gewesen wären. Gleiches gilt auch für die RNA- und Proteinanalysen, bei denen eine aussagekräftige Untersuchung ohne störende Bestandteile der Tumorzellen nur durch die Fixierung mit Paraformaldehyd möglich wurde.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, die verwendeten Methoden so zu etablieren, dass sie in einem routinemäßigen Einsatz in Immuntherapieeinheiten zur Bestimmung der T-Zell Aktivierung einfach einsetzbar sind. Hierbei sollte vor allem auf den Einsatz radioaktiver Methoden verzichtet werden. Dieses Ziel konnte in vollem Umfang erreicht werden, da nur für den Einsatz der zellulären Vakzine in der klinischen B7-Studie die radioaktive Bestrahlung notwendig ist.

8. Identifizierung von Biomarkern Vakzin aktivierter T-Zellen

Neben der Entwicklung neuer oder verbesserter Therapiekonzepte ist auch das Monitoren des Therapieerfolgs von entscheidender Bedeutung. Während viele Analysensysteme meist nur in der Lage sind, wenige Parameter gleichzeitig zu untersuchen, hat die Proteomanalyse das Potential einen umfassenden Überblick über den Aktivierungsstatus von T-Zellen zu geben (Mosca et al., 2003).

In dieser Arbeit wurden die B7 transfizierten Tumorzellen MZ1257RC B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 zusammen mit der Vektorkontrolle und der Wildtyp Zelllinie MZ1257RC zur Stimulation von HLA-A2⁺ T-Zellen mit anschließender Proteomanalyse der T-Zellen eingesetzt.

Die funktionelle T-Zell Aktivierung konnte durch die Analyse der Zytokinsekretion gezeigt werden. Beide T-Zell Präparationen produzierten IFN γ , GM-CSF, TNF α und IL-10 nach Stimulation mit den B7 transfizierten Tumorzellen. Entsprechend der vorhergehenden Untersuchungen wurde IFN γ und GM-CSF in gleichen Mengen nach Stimulation durch B7-1 bzw. B7-2 sekretiert, während B7-2 die Produktion von IL-10 und TNF α stärker stimulierte als B7-1 (Abb. 84).

In der Proteomanalyse konnten 45 differentiell exprimierte Proteinspots identifiziert werden (Abb. 85). Wenige Proteine verschwanden durch eine Stimulation mit B7 oder wurden neu induziert, die meisten der auffälligen Proteine waren in ihrer Expression verändert (Abb. 86, Anhang X. 4.).

Zu diesen Proteinen zählen zwei Proteine unbekannter Funktion sowie verschiedene Proteine, die an Signalkaskaden beteiligt sind, wie z.B. Stathmin, rho GDI, Neuropolypeptid h3 oder Differenzierungsfaktoren wie der Glia Maturationfaktor und die RNA bindende Untereinheit. Verschiedene dieser Proteine sind interessante Kandidatenproteine für Biomarker zur Charakterisierung einer erfolgreichen Immunantwort. Besonders interessant sind dabei Proteine, die durch eine Stimulierung mit B7 stärker exprimiert werden, wie z.B. das nukleäre Zellprolife-

rationsantigen PCNA, Stathmin, aber auch Proteine, die ihre Größe gravierend verändern, wie z.B. das GrpE Homolog 1 (Abb. 86 rechts).

Nach diesen Analysen schloss sich eine weitere Versuchsreihe zu Identifikation phosphorylierter Proteine an. Dazu wurden HLA-A2⁺ T-Zellen für 15min, 60min und 24h mit den B7 transfizierten Tumorzellen stimuliert. Phosphorylierte Proteine konnten isoliert und aufgetrennt werden (Abb. 89). Die isolierte Proteinmenge war so gering, dass pro Ansatz nur eine Analyse durchgeführt werden konnte. Eine Identifikation auffälliger Proteine war daher nur über den Vergleich mit den Proteinen vorangegangener Analysen möglich (Anhang X. 5.). Daher konnten einige schwach phosphorylierte Proteine, die Unterschiede in ihrer Expression zwischen B7-1 und B7-2 Stimulation zeigten, (Abb. 90) nicht identifiziert werden. Unter den identifizierten Spots sind aber interessante Proteine, die zum großen Teil direkt oder indirekt an Signalkaskaden in T-Zellen beteiligt sind, wie Stathmin, Splicefaktor p32, ran, rho GDI, Initiationsfaktor 5a, Phosphoglycerat Mutase 2, Prefoldin 5 und Neuropolypeptid h3.

Die Moleküle rho GDI und Neuropolypeptid h3 (raf Kinase Inhibitor) sind direkt in die ras-vermittelte Signalkaskade involviert, die durch die Bindung des T-Zell Rezeptors an die Tumorzelle durch das erste Signal ausgelöst wird (Alegre et al., 2001). Diese Signalkaskade führt u.a zur Aktivierung von c-myc, dessen Funktion durch Prefoldin 5 blockiert wird.

Die Proteine PCNA, RNA bindende Untereinheit, GSTPi, Stathmin, Glia Maturationfaktor, ran, Apolipoprotein A1 und SMT3A sind miteinander und mit dem Zellzyklus assoziiert (Abb. 93, 95).

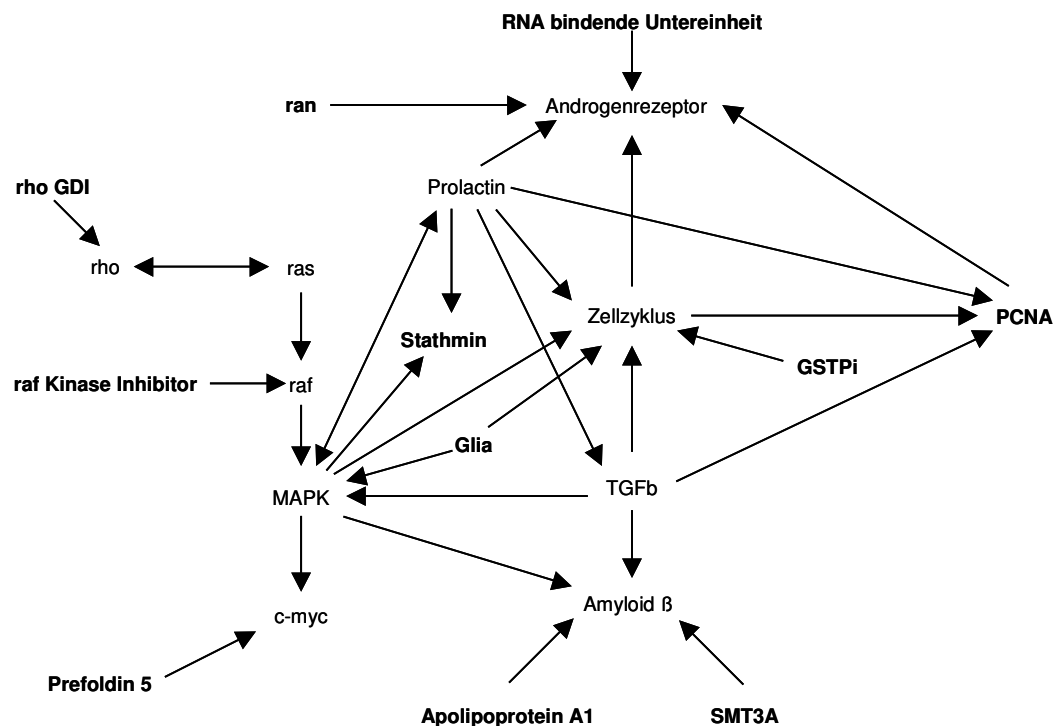


Abb. 95 Interaktionen zwischen Proteinen involviert in die B7 Costimulation von T-Zellen

Zur weiteren Evaluierung der identifizierten Proteinspots wurden verschiedene Western Blot (Abb. 91) und RT-PCR Analysen (Abb. 92) durchgeführt.

Besonders auffällig zeigte sich dabei Stathmin (Sobel, 1991), das eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion verschiedener *second messenger* Systeme spielt (Nagasaka et al., 2002). Die Zellen zeigten eine deutliche Hochregulation der Stathmin Proteinexpression in Proteom- und Western Blot Analyse (Abb. 91, Anhang X. 4) und der RNA-Expression in RT-PCR

Analysen (Abb. 92) nach T-Zell Stimulation mit B7 exprimierenden Tumorzellen im Vergleich zur Expression in Kontrollansätzen. Weiterhin konnte Stathmin auch in phosphorylierter Form identifiziert werden (Anhang X. 5). Stathmin ist somit geeignet für einen Einsatz als Biomarker zur Untersuchung einer erfolgreichen Vakzinierung von antigenspezifischen T-Zellen durch B7 transfizierte Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*.

Ein weiteres Protein, dessen Expression durch Stimulation mit B7 hochreguliert wurde ist PCNA (Abb. 91, Anhang X.4). Dieses Protein, dessen Expression mit dem Proliferationsstatus der Zelle korreliert (Bravo, 1986; Hasan et al., 2001) scheint ebenfalls als Biomarker zur Evaluierung einer erfolgreichen Vakzinierung geeignet.

Die beiden Enzyme Nudix Hydrolase nudt5 (Yang et al., 2000) und Transaldolase 1 (Banki et al., 1994) zeigten Unterschiede in ihrer Expression zwischen T-Zellen, die mit B7-1 bzw. B7-2 stimuliert wurden. In den Proteomanalysen (Anhang X.4.) und den RT-PCR RNA-Analysen (Abb. 92) zeigte sich eine erhebliche geringere Expression in T-Zellen, die mit B7-1 stimuliert wurden. Dadurch sind diese beiden Enzyme als Biomarker zur Identifikation Vakzin aktivierter T-Zellen zwar nur für Ansätze mit B7-2 einsetzbar, aber sie bieten die Möglichkeit, die Unterschiede zwischen der Stimulation mit B7-1 bzw. B7-2 weiter zu untersuchen. Vielleicht lassen sich so Erkenntnisse gewinnen, die den Unterschied in der Zytokinsekretion zwischen IFN γ /GM-CSF und TNF α /IL-10 erklären können.

Die beiden Inhibitoren Neuropolypeptid h3 (Hori et al., 1994) und das PDGF Bindeprotein (Fischer und Schubert, 1996) zeigten ihre Eignung als Biomarker durch eine einheitliche Herunterregulation von Protein- (Anhang X.4.) und RNA-Expression (Abb. 92) nach Stimulation mit B7-1 und B7-2. Während das Neuropolypeptid h3 durch seine Bindung als raf Kinase Inhibitor (Banfield et al., 1998; Yeung et al., 1999; Corbit et al., 2003) schon gut charakterisiert ist und auch durch seine Phosphorylierung nach B7 Stimulation (Anhang IX.5) seine Funktion andeutet, ist das PDGF Bindeprotein bis jetzt noch sehr wenig charakterisiert und ist somit für weitergehende Untersuchungen sehr interessant.

Die Erstellung eines Netzwerkes von Proteininteraktionen aufgrund extrahierter Zusammenhänge aus *Medline abstracts* konnten Beziehungen zwischen elf der identifizierten Proteine aufzeigen (Abb. 93, 95). Die gefundenen Interaktionen werden über erwartete Elemente wie den ras/raf/MAPK Signalweg und den Zellzyklus, aber auch überraschende Elemente wie den Androgenrezeptor, Prolactin oder Amyloid β vermittelt. Vor allem die intensive Analyse der unerwarteten Elemente wird bei weiteren Untersuchungen essentielle Aufschlüsse über die B7 Costimulation von T-Zellen aufdecken.

9. Ausblick

Die Immuntherapie ist auf einem vielversprechenden Weg, der sein Potential jetzt in klinischen Einsätzen zeigen muss.

Dies gilt auch für die in dieser Arbeit vorgestellte klinische Studie mit B7-transfizierten Tumorzellen. Die Laborversuche zeigten gute T-Zell stimulatorische Eigenschaften und somit ist diese erste klinische Studie erfolversprechend. Ob dieser Ansatz bereits für eine deutliche Verbesserung der Prognose für Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom sorgen wird, muss der *in vivo* Einsatz zeigen. Die in dieser Arbeit entwickelte SOP garantiert jedem Patienten ein großes Maß an Sicherheit gegenüber einem guten immunaktivierenden Potential.

Sollte die klinischen Ergebnisse nicht mit den *in vitro* Daten übereinstimmen, hat diese Arbeit mehrere Möglichkeiten der Modifikation gezeigt. Sollte es sich herausstellen, dass der Bestrahlungsablauf zu langwierig ist, kann man die Zellfixierung mit Paraformaldehyd als Alternative einsetzen. Dies würde den Ablauf erheblich beschleunigen und das zelluläre Vakzin

könnte komplett am Ort der Verabreichung vorbereitet werden. Das immunogene Potential fixierter Zellen für eine effektive T-Zell Aktivierung hat diese Arbeit deutlich gezeigt.

Ist der immunstimulierende Effekt aufgrund zu geringer Antigenpräsentation nicht ausreichend, steht der Einsatz von B7 Retroviren mit autologen Tumorzellen für knapp 50% der Patienten zur Verfügung. Da das zelluläre Vakzin vor dem Einsatz sicher inaktiviert wird, ist hier das Risiko durch die nicht vermehrungsfähigen Retroviren sehr gering. Dies zeigt die Wiederaufnahme mehrerer Studien mit Retroviren, die nicht mit Knochenmarkstammzellen arbeiten.

Schwierig umzusetzen, wenn auch ebenfalls sehr vielversprechend, wäre der Einsatz eines retroviralen Systems zu Expression eines CTLA-4 Ribozyms. Da hier T-Zellen transfiziert werden müssen, die anschließend lebend den Patienten zurück gegeben werden, sind hier noch einige Verbesserungen, vor allem im Bereich der Sicherheit beim Einsatz von Retroviren, abzuwarten. Für einen weiteren *in vitro* Einsatz im Labor stellen diese Ribozyme allerdings ein äußerst interessantes Werkzeug dar.

Die B7 homologen Moleküle spielen mit Sicherheit eine Rolle bei der T-Zell Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen. In dieser Arbeit konnte die Expression von B7-H2 in sehr vielen Analysen gefunden werden. Da einige Zelllinien keine bzw. eine induzierbare RNA Expression zeigten, sind diese Zelllinien sehr interessant für weitergehende grundlegende Untersuchungen der B7-H2 Funktion. Auch die verschiedenen B7-H2 Varianten bieten Potential, noch mehr über die B7-H2 Funktion zu erfahren. Als zelluläres Vakzin scheinen sich B7-H2 Transfektanten nach den Untersuchungen dieser Arbeit nicht zu eignen.

Weiterhin sollte man die Expression der B7 homologen Moleküle bei klinischen Vakzinierungen beobachten, da sich z.B. eine starke Expression von B7-H1 negativ auf den Therapieerfolg auswirken könnte und durch IFN γ induzierbar ist.

Die durch eingehende Untersuchungen des T-Zell Proteoms nach Stimulierung mit B7 transfizierten Tumorzellen identifizierten Proteine müssen weiter intensiv auf ihre Eignung als Biomarker untersucht werden. Endpunkt einer solchen Markerdefinition könnte ein Art von Markerproteom sein, dass man zum Vergleich mit Proteomen aus dem Serum vakzinierter Patienten heranziehen könnte. Darüber wäre eine sichere, frühe Prognose des Therapieerfolges möglich. Dieser Ansatz bedarf allerdings noch einiger Weiterentwicklungen im Bereich der Miniaturisierung und Standardisierung solcher Analysen.

Für das grundlegende Verständnis der T-Zell Costimulation lieferten diese Analysen wertvolle Erkenntnisse und sie sollen daher auf T-Zellen ausgeweitet werden, die mit chimären Rezeptoren transfiziert wurden. Diese Rezeptoren sind in der Lage, über eine TZR-(CD3 ζ -) und eine CD28-Signaldomäne beide Signale für eine T-Zell Aktivierung zu vermitteln. Ein Vergleich solcher Proteomanalysen wird Erkenntnisse zur T-Zell Aktivierung liefern.

Die weitere, intensive Analyse der in dieser Arbeit durch Proteomanalyse und Erstellung von Proteinnetzwerken identifizierten Proteine wird weitere grundlegende Zusammenhänge für das Verständnis der B7 Costimulation von T-Zellen aufzeigen.

Wenn die Ergebnisse auch aus anderen klinischen Studien z.B. mit Peptiden, dendritischen Zellen oder auch B-Zellen vorliegen, wird sich zeigen, wohin der Weg der Immuntherapie geht. Die theoretischen Ansätze sind sehr vielversprechend, da sie eine gute spezifische Immunantwort mit geringen Nebenwirkungen und langanhaltender Immunität erwarten lassen. Dass die Immuntherapie die Chemotherapie langfristig auch bei anderen Krebsformen ersetzen kann, bleibt zu hoffen.

VII. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte das Potential der T-Zell Aktivierung durch B7-1 bzw. B7-2 exprimierende Nierenkarzinomzellen gezeigt werden. Nach B7 vermittelter Costimulation beginnen die T-Zellen zu proliferieren, produzieren Zytokine und entwickeln zytotoxische Aktivität. Parallel dazu wurde zum Einsatz dieser Zellen zur allogenen Vakzinierung von Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom eine SOP „Bestrahlung und Verabreichung des zellulären B7-Vakzins“ zum Einsatz in einer klinischen Pilotstudie etabliert.

Eingehende *in vitro* Untersuchungen mit B7 exprimierenden Zellklonen zeigten, dass die T-Zell Aktivierung von der Menge der B7 Oberflächenmoleküle des zellulären Vakzins abhängt. Eine gesteigerte B7-Menge auf der Zelloberfläche führt zu einer gesteigerten T-Zell Antwort bis zu einem Optimum von 1,25 Mio B7 Molekülen pro Zelle. Eine Stimulation mit 2,4 Mio B7-2 Molekülen führt zu einer reduzierten T-Zell Aktivierung. Es wurden auch verschiedene Unterschiede zwischen der Stimulation mit B7-1 bzw. B7-2 und der Stimulierung HLA-gematchter bzw. ungematchter T-Zellen gefunden. Während die T-Zell Proliferation in allen Ansätzen ähnlich war, war die Sekretion von TNF α und IL-10 immer stärker bei Stimulation mit B7-2 exprimierenden Tumorzellen gegenüber B7-1 exprimierenden Zellen. Dieses unterschiedliche Aktivierungsmuster zeigte sich auch bei der IFN γ und GM-CSF Sekretion HLA gematchter T-Zellen, nicht aber bei ungematchten T-Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein retrovirales Vektorsystem zur Expression von B7-1 und B7-2 etabliert, dass eine schnelle und effiziente Herstellung von autologen B7 Tumorzellen für zukünftige klinische Studien bietet. Durch eine hohe Transfektionseffizienz konnte auf den Einsatz immunogener Selektionsmarker verzichtet werden. Die so hergestellten Vakzine hatten *in vitro* gute T-Zell stimulierende Eigenschaften, wobei hier die T-Zell Aktivierung durch B7-1 Costimulation effizienter funktionierte.

Durch die Klonierung eines Ribozyms für CTLA-4 konnte ein weiterer Weg für neue Therapieansätze eröffnet werden. Die Funktion des Ribozyms konnte in einem plasmidbasierten System gezeigt werden und für den klinischen Einsatz stehen retrovirale Expressionssysteme für das CTLA-4 Ribozym zur Verfügung.

Die Expression der B7-homologen Moleküle wurde mit dem Schwerpunkt auf B7-H2 untersucht. Der Ligand des induzierbaren Costimulators ICOS ist ungeeignet zum Einsatz als zelluläres Vakzin, denn durch eine B7-H2 Überexpression in einer Nierenkarzinomzelllinie konnte keine signifikante T-Zell Aktivierung erreicht werden.

Der Ligand von PD-1, der negativ regulatorische Costimulator B7-H1, zeigte eine gute RNA Expression in allen Nierenkarzinomzelllinien nach Stimulation mit IFN γ . Die B7-H1 Expression muss daher *in vitro* und *in vivo* beachtet werden.

Zur Analyse der Proteinexpression von durch B7 Vakzinen aktivierten T-Zellen wurden Proteom- und Phosphoproteomanalysen durchgeführt. Dabei gelang die Identifizierung von 45 Proteinen, von denen nach weiterer Evaluierung Stathmin, PCNA, Neuropolypeptid h3 und das PDGF Bindeprotein ihre Eignung als Marker für eine erfolgreiche Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen durch zelluläre B7 Vakzine zeigen konnten.

Durch die Generierung von Proteinnetzwerken konnten elf der identifizierten Proteine in funktionellen Zusammenhang gebracht und essentielle Elemente für die B7 Costimulation von T-Zellen aufgezeigt werden.

Die Relevanz der neuen Einblicke in die B7 Costimulation und das Potential der aufgezeigten neuen therapeutischen Ansätze dieser Arbeit werden sich in Zukunft zeigen.

VIII. Literatur

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman und J. S. Pober.** 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Abken, H., A. Hombach, C. Heuser, K. Kronfeld und B. Seliger.** 2002. Tuning tumor-specific T-cell activation: a matter of costimulation? *Trends Immunol* 23:240.
- Acuto, O., S. Mise-Omata, G. Mangino und F. Michel.** 2003. Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: the mechanism of CD28 costimulatory receptor. *Immunol Rev* 192:21.
- Afrikanova, I., E. Yeh, D. Bartos, S. S. Watowich und G. D. Longmore.** 2002. Oncogene cooperativity in Friend erythroleukemia: erythropoietin receptor activation by the env gene of SFFV leads to transcriptional upregulation of PU.1, independent of SFFV proviral insertion. *Oncogene* 21:1272.
- Akagi, J., J. W. Hodge, J. P. McLaughlin, L. Gritz, G. Mazzara, D. Kufe, J. Schlom und J. A. Kantor.** 1997. Therapeutic antitumor response after immunization with an admixture of recombinant vaccinia viruses expressing a modified MUC1 gene and the murine T-cell costimulatory molecule B7. *J Immunother* 20:38.
- Akkina, R., A. Banerjea, J. Bai, J. Anderson, M. J. Li und J. Rossi.** 2003. siRNAs, ribozymes and RNA decoys in modeling stem cell-based gene therapy for HIV/AIDS. *Anticancer Res* 23:1997.
- Alberola-Ila, J. und G. Hernandez-Hoyos.** 2003. The Ras/MAPK cascade and the control of positive selection. *Immunol Rev* 191:79.
- Alegre, M. L., K. A. Frauwirth und C. B. Thompson.** 2001. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 1:220.
- Amato, R. J.** 2000. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 27:177.
- Antonia, S. J., J. Seigne, J. Diaz, C. Muro-Cacho, M. Extermann, M. J. Farmelo, M. Friberg, M. Alsarraj, J. J. Mahany, J. Pow-Sang, A. Cantor und W. Janssen.** 2002. Phase I trial of a B7-1 (CD80) gene modified autologous tumor cell vaccine in combination with systemic interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 167:1995.
- Antonia, S. J. und J. D. Seigne.** 2000. B7-1 gene-modified autologous tumor-cell vaccines for renal-cell carcinoma. *World J Urol* 18:157.
- Aruffo, A. und B. Seed.** 1987. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8573.
- Asea, A., S. K. Kraeft, E. A. Kurt-Jones, M. A. Stevenson, L. B. Chen, R. W. Finberg, G. C. Koo und S. K. Calderwood.** 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6:435.

- Avigan, D.** 2003. Fusions of breast cancer and dendritic cells as a novel cancer vaccine. *Clin Breast Cancer 3 Suppl 4:S158*.
- Ayuk, F., Z. Li, K. Kuhlcke, C. Lindemann, U. Schade, H. G. Eckert, A. Zander und B. Fehse.** 1999. Establishment of an optimised gene transfer protocol for human primary T lymphocytes according to clinical requirements. *Gene Ther 6:1788*.
- Bai, X. F., J. Liu, K. F. May, Jr., Y. Guo, P. Zheng und Y. Liu.** 2002. B7-CTLA4 interaction promotes cognate destruction of tumor cells by cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Blood 99:2880*.
- Banfield, M. J., J. J. Barker, A. C. Perry und R. L. Brady.** 1998. Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure 6:1245*.
- Banki, K., D. Halladay und A. Perl.** 1994. Cloning and expression of the human gene for transaldolase. A novel highly repetitive element constitutes an integral part of the coding sequence. *J Biol Chem 269:2847*.
- Baroja, M. L., D. Luxenberg, T. Chau, V. Ling, C. A. Strathdee, B. M. Carreno und J. Madrenas.** 2000. The inhibitory function of CTLA-4 does not require its tyrosine phosphorylation. *J Immunol 164:49*.
- Baum, C., J. Dullmann, Z. Li, B. Fehse, J. Meyer, D. A. Williams und C. von Kalle.** 2003. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood 101:2099*.
- Berney, S. M., T. Schaan, R. E. Wolf, D. L. Kimpel, H. van der Heyde und T. P. Atkinson.** 2001. CD5 (OKT1) augments CD3-mediated intracellular signaling events in human T lymphocytes. *Inflammation 25:215*.
- Bertram, S. und H. G. Gassen.** 1998. *Gentechnische Methoden*. Urban & Fischer, München.
- Bonini, C., G. Ferrari, S. Verzeletti, P. Servida, E. Zappone, L. Ruggieri, M. Ponzoni, S. Rossini, F. Mavilio, C. Traversari und C. Bordignon.** 1997. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science 276:1719*.
- Borriello, F., M. P. Sethna, S. D. Boyd, A. N. Schweitzer, E. A. Tivol, D. Jacoby, T. B. Strom, E. M. Simpson, G. J. Freeman und A. H. Sharpe.** 1997. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity 6:303*.
- Bravo, R.** 1986. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res 163:287*.
- Brinkmann, O. A., J. Roigas und L. Hertle.** 2002. [Systemic immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma and long- term outcome]. *Urologe A 41:231*.
- Briones, J., J. M. Timmerman, D. L. Panicali und R. Levy.** 2003. Antitumor immunity after vaccination with B lymphoma cells overexpressing a triad of costimulatory molecules. *J Natl Cancer Inst 95:548*.

- Brown, J. A., D. M. Dorfman, F. R. Ma, E. L. Sullivan, O. Munoz, C. R. Wood, E. A. Greenfield und G. J. Freeman.** 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 170:1257.
- Buhmann, J. E., S. K. Elkin und A. H. Sharpe.** 2003. A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J Immunol* 170:5421.
- Cantrell, D. A.** 2003. GTPases and T cell activation. *Immunol Rev* 192:122.
- Carreno, B. M., F. Bennett, T. A. Chau, V. Ling, D. Luxenberg, J. Jussif, M. L. Baroja und J. Madrenas.** 2000. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol* 165:1352.
- Carreno, B. M. und M. Collins.** 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:29.
- Castellino, F., P. E. Boucher, K. Eichelberg, M. Mayhew, J. E. Rothman, A. N. Houghton und R. N. Germain.** 2000. Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med* 191:1957.
- Cepero, E., H. J. Hnatyszyn, G. Kraus und M. G. Lichtenheld.** 1998. Potent inhibition of CTLA-4 expression by an anti-CTLA-4 ribozyme. *Biochem Biophys Res Commun* 247:838.
- Chambers, C. A., M. S. Kuhns, J. G. Egen und J. P. Allison.** 2001. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 19:565.
- Chang, A. E., Q. Li, G. Jiang, D. M. Sayre, T. M. Braun und B. G. Redman.** 2003. Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer. *J Clin Oncol* 21:884.
- Chang, T. T., C. Jabs, R. A. Sobel, V. K. Kuchroo und A. H. Sharpe.** 1999. Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 190:733.
- Chapoval, A. I., J. Ni, J. S. Lau, R. A. Wilcox, D. B. Flies, D. Liu, H. Dong, G. L. Sica, G. Zhu, K. Tamada und L. Chen.** 2001. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2:269.
- Childs, R. und R. Srinivasan.** 2002. Advances in allogeneic stem cell transplantation: directing graft-versus-leukemia at solid tumors. *Cancer J* 8:2.
- Childs, R. W.** 2002. Immunotherapy of solid tumors: nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *MedGenMed* 4:13.
- Chretien, S., F. Moreau-Gachelin, F. Apiou, G. Courtois, P. Mayeux, B. Dutrillaux, J. P. Cartron, S. Gisselbrecht und C. Lacombe.** 1994. Putative oncogenic role of the erythropoietin receptor in murine and human erythroleukemia cells. *Blood* 83:1813.
- Cinek, T., A. Sadra und J. B. Imboden.** 2000. Cutting edge: tyrosine-independent transmission of inhibitory signals by CTLA-4. *J Immunol* 164:5.

- Corbit, K. C., N. Trakul, E. M. Eves, B. Diaz, M. Marshall und M. R. Rosner.** 2003. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem* 278:13061.
- Costello, P. S., M. Gallagher und D. A. Cantrell.** 2002. Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nat Immunol* 3:1082.
- Creusot, R. J., N. A. Mitchison und N. M. Terazzini.** 2002. The immunological synapse. *Mol Immunol* 38:997.
- Cullinan, P., A. I. Sperling und J. K. Burkhardt.** 2002. The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol Rev* 189:111.
- Daliani, D. D., C. N. Papandreou, P. F. Thall, X. Wang, C. Perez, R. Oliva, L. Pagliaro und R. Amato.** 2002. A pilot study of thalidomide in patients with progressive metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 95:758.
- Davis, D. M.** 2002. Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. *Trends Immunol* 23:356.
- Davis, S. J., S. Ikemizu, E. J. Evans, L. Fugger, T. R. Bakker und P. A. van der Merwe.** 2003. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat Immunol* 4:217.
- Decker, T., S. Hipp, R. J. Kreitman, I. Pastan, C. Peschel und T. Licht.** 2002. Sensitization of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells to recombinant immunotoxin by immunostimulatory phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Blood* 99:1320.
- Dong, C., R. I. Nurieva und D. V. Prasad.** 2003. Immune regulation by novel costimulatory molecules. *Immunol Res* 28:39.
- Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis und L. Chen.** 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8:793.
- Dong, H., G. Zhu, K. Tamada und L. Chen.** 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5:1365.
- Drachenberg, D. und R. W. Childs.** 2003. Allogeneic stem cell transplantation as immunotherapy for renal cell carcinoma: from immune enhancement to immune replacement. *Urol Clin North Am* 30:611.
- Dreikhausen, U. E., K. Gorf, K. Resch und M. Szamel.** 2003. Protein kinase C β 1, a major regulator of TCR-CD28-activated signal transduction leading to IL-2 gene transcription and secretion. *Int Immunol* 15:1089.
- Dunussi-Joannopoulos, K., G. Dranoff, H. J. Weinstein, J. L. Ferrara, B. E. Bierer und J. M. Croop.** 1998. Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with B7 family and other cytokine vaccines. *Blood* 91:222.

- Dustin, M. L. und D. R. Colman.** 2002. Neural and immunological synaptic relations. *Science* 298:785.
- Dyall, J., J. B. Latouche, S. Schnell und M. Sadelain.** 2001. Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 97:114.
- Ebara, S., S. Shimura, Y. Nasu, H. Kaku, H. Kumon, G. Yang, J. Wang, T. L. Timme, E. Aguilar-Cordova und T. C. Thompson.** 2002. Gene therapy for prostate cancer: toxicological profile of four HSV-tk transducing adenoviral vectors regulated by different promoters. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 5:316.
- Egen, J. G. und J. P. Allison.** 2002. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16:23.
- Egen, J. G., M. S. Kuhns und J. P. Allison.** 2002. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* 3:611.
- Engels, B., H. Cam, T. Schuler, S. Indraccolo, M. Gladow, C. Baum, T. Blankenstein und W. Uckert.** 2003. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 14:1155.
- Espenschied, J., J. Lamont, J. Longmate, S. Pendas, Z. Wang, D. J. Diamond und J. D. Ellenhorn.** 2003. CTLA-4 Blockade Enhances the Therapeutic Effect of an Attenuated Poxvirus Vaccine Targeting p53 in an Established Murine Tumor Model. *J Immunol* 170:3401.
- Falt, S., K. Holmberg, B. Lambert und A. Wennborg.** 2003. Long-term global gene expression patterns in irradiated human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1:1.
- Faroudi, M., R. Zaru, B. Favier und S. Valitutti.** 2002. New insights to the functional role of the T cell-antigen presenting cell immunological synapse. *Biol Res* 35:133.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold und M. Danielsen.** 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7413.
- Feng, Y., M. Leavitt, R. Tritz, E. Duarte, D. Kang, M. Mamounas, P. Gilles, F. Wong-Staal, S. Kennedy, J. Merson, M. Yu und J. R. Barber.** 2000. Inhibition of CCR5-dependent HIV-1 infection by hairpin ribozyme gene therapy against CC-chemokine receptor 5. *Virology* 276:271.
- Fields, P. E., R. J. Finch, G. S. Gray, R. Zollner, J. L. Thomas, K. Sturmhoefel, K. Lee, S. Wolf, T. F. Gajewski und F. W. Fitch.** 1998. B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells. *J Immunol* 161:5268.
- Fischer, W. H. und D. Schubert.** 1996. Characterization of a novel platelet-derived growth factor-associated protein. *J Neurochem* 66:2213.
- Fratelli, M., H. Demol, M. Puype, S. Casagrande, I. Eberini, M. Salmona, V. Bonetto, M. Mengozzi, F. Duffieux, E. Miclet, A. Bachi, J. Vandekerckhove, E. Gianazza und P.**

- Ghezzi.** 2002. Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3505.
- Freeman, G. J., F. Borriello, R. J. Hodes, H. Reiser, K. S. Hathcock, G. Laszlo, A. J. McKnight, J. Kim, L. Du, D. B. Lombard, G. S. Gray, L. M. Nadler und A. H. Sharpe.** 1993a. Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice. *Science* 262:907.
- Freeman, G. J., J. G. Gribben, V. A. Boussiotis, J. W. Ng, V. A. Restivo, Jr., L. A. Lombard, G. S. Gray und L. M. Nadler.** 1993b. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262:909.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood und T. Honjo.** 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027.
- Freeman, G. J., A. H. Sharpe und V. K. Kuchroo.** 2002. Protect the killer: CTLs need defenses against the tumor. *Nat Med* 8:787.
- Galligioni, E., M. Quaia, A. Merlo, A. Carbone, A. Spada, D. Favaro, M. Santarosa, C. Sacco und R. Talamini.** 1996. Adjuvant immunotherapy treatment of renal carcinoma patients with autologous tumor cells and bacillus Calmette-Guerin: five-year results of a prospective randomized study. *Cancer* 77:2560.
- Ginn, S. L., J. Fleming, P. B. Rowe und I. E. Alexander.** 2003. Promoter interference mediated by the U3 region in early-generation HIV-1-derived lentivirus vectors can influence detection of transgene expression in a cell-type and species-specific manner. *Hum Gene Ther* 14:1127.
- Glade-Bender, J., J. J. Kandel und D. J. Yamashiro.** 2003. VEGF blocking therapy in the treatment of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 3:263.
- Gluzman, Y.** 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175.
- Gong, J., D. Chen, M. Kashiwaba und D. Kufe.** 1997. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 3:558.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell und R. Nairn.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59.
- Gratzner, H. G.** 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474.
- Greenwald, R. J., Y. E. Latchman und A. H. Sharpe.** 2002. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 14:391.
- Greiner, J. W., H. Zeytin, M. R. Anver und J. Schlom.** 2002. Vaccine-based therapy directed against carcinoembryonic antigen demonstrates antitumor activity on spontaneous intestinal tumors in the absence of autoimmunity. *Cancer Res* 62:6944.

- Griffin, M. D., D. K. Hong, P. O. Holman, K. M. Lee, M. J. Whitters, S. M. O'Herrin, F. Fallarino, M. Collins, D. M. Segal, T. F. Gajewski, D. M. Kranz und J. A. Bluestone.** 2000. Blockade of T cell activation using a surface-linked single-chain antibody to CTLA-4 (CD152). *J Immunol* 164:4433.
- Grolleau, A., J. Bowman, B. Pradet-Balade, E. Puravs, S. Hanash, J. A. Garcia-Sanz und L. Beretta.** 2002. Global and specific translational control by rapamycin in T cells uncovered by microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 277:22175.
- Guinan, P., L. H. Sobin, F. Algaba, F. Badellino, S. Kameyama, G. MacLennan und A. Novick.** 1997. TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80:992.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J. L. Villeval, C. C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo und A. Fischer.** 2003. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348:255.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557.
- Hasan, S., P. O. Hassa, R. Imhof und M. O. Hottiger.** 2001. Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature* 410:387.
- Hathcock, K. S., G. Laszlo, C. Pucillo, P. Linsley und R. J. Hodes.** 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 180:631.
- Hawker, J. R., Jr.** 2003. Chemiluminescence-based BrdU ELISA to measure DNA synthesis. *J Immunol Methods* 274:77.
- Hawryluk, T. und I. Hirshfield.** 2002. A superantigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A. *J Food Prot* 65:1183.
- Haynes, N. M., J. A. Trapani, M. W. Teng, J. T. Jackson, L. Cerruti, S. M. Jane, M. H. Kershaw, M. J. Smyth und P. K. Darcy.** 2002. Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. *Blood* 100:3155.
- Heiser, A., D. Coleman, J. Dannull, D. Yancey, M. A. Maurice, C. D. Lallas, P. Dahm, D. Niedzwiecki, E. Gilboa und J. Vieweg.** 2002. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 109:409.
- Heiser, A., M. A. Maurice, D. R. Yancey, D. M. Coleman, P. Dahm und J. Vieweg.** 2001. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res* 61:3388.
- Hentschke, P., L. Barkholt, M. Uzunel, J. Mattsson, P. Wersall, P. Pisa, J. Martola, N. Albiin, A. Wernerson, M. Soderberg, M. Remberger, A. Thorne und O. Ringden.** 2003.

- Low-intensity conditioning and hematopoietic stem cell transplantation in patients with renal and colon carcinoma. *Bone Marrow Transplant* 31:253.
- Hermanek, P.** 1998. *illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren*. Springer, Berlin (u.a.).
- Heukeshoven, J. und R. Dernick.** 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9:28.
- Hildinger, M., K. L. Abel, W. Ostertag und C. Baum.** 1999. Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* 73:4083.
- Hill, J. A., T. E. Ichim, K. P. Kuznierzuk, M. Li, X. Huang, X. Yan, R. Zhong, E. Cairns, D. A. Bell und W. P. Min.** 2003. Immune modulation by silencing IL-12 production in dendritic cells using small interfering RNA. *J Immunol* 171:691.
- Hirosawa, M., M. Hoshida, M. Ishikawa und T. Toya.** 1993. MASCOT: multiple alignment system for protein sequences based on three-way dynamic programming. *Comput Appl Biosci* 9:161.
- Hodge, J. W., D. W. Grosenbach, W. M. Aarts, D. J. Poole und J. Schlom.** 2003. Vaccine therapy of established tumors in the absence of autoimmunity. *Clin Cancer Res* 9:1837.
- Hodge, J. W., D. W. Grosenbach, A. N. Rad, M. Giuliano, H. Sabzevari und J. Schlom.** 2001. Enhancing the potency of peptide-pulsed antigen presenting cells by vector-driven hyperexpression of a triad of costimulatory molecules. *Vaccine* 19:3552.
- Hodi, F. S., M. C. Mihm, R. J. Soiffer, F. G. Haluska, M. Butler, M. V. Seiden, T. Davis, R. Henry-Spires, S. MacRae, A. Willman, R. Padera, M. T. Jaklitsch, S. Shankar, T. C. Chen, A. Korman, J. P. Allison und G. Dranoff.** 2003. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4712.
- Hombach, A., A. Wiczarkowicz, T. Marquardt, C. Heuser, L. Usai, C. Pohl, B. Seliger und H. Abken.** 2001. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol* 167:6123.
- Hori, N., K. S. Chae, K. Murakawa, R. Matoba, A. Fukushima, K. Okubo und K. Matsubara.** 1994. A human cDNA sequence homologue of bovine phosphatidylethanolamine-binding protein. *Gene* 140:293.
- Horig, H., D. S. Lee, W. Conkright, J. Divito, H. Hasson, M. LaMare, A. Rivera, D. Park, J. Tine, K. Guito, K. W. Tsang, J. Schlom und H. L. Kaufman.** 2000. Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule. *Cancer Immunol Immunother* 49:504.

- Howard, T. A., J. M. Rochelle und M. F. Seldin.** 1991. Cd28 and Ctla-4, two related members of the Ig supergene family, are tightly linked on proximal mouse chromosome 1. *Immunogenetics* 33:74.
- Hu, W. S. und V. K. Pathak.** 2000. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol Rev* 52:493.
- Hung, C. F., W. F. Cheng, K. F. Hsu, C. Y. Chai, L. He, M. Ling und T. C. Wu.** 2001. Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. *Cancer Res* 61:3698.
- Hurwitz, A. A., P. Yanover, M. Markowitz, J. P. Allison und E. D. Kwon.** 2003. Prostate cancer: advances in immunotherapy. *BioDrugs* 17:131.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos und R. A. Kroczeck.** 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263.
- Jaeger, E., M. Ringhoffer, H. P. Dienes, M. Arand, J. Karbach, D. Jager, C. Ilseemann, M. Hagedorn, F. Oesch und A. Knuth.** 1996. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int J Cancer* 67:54.
- James, S. P.** 1994. Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. In *Current Protocols in Immunology*, Vol. Vol.1. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, und W. Strober, eds. John Wiley & Sons, New York, p. 7.10.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop und A. H. Enk.** 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27:3135.
- Jung, D., C. Hilmes, A. Knuth, E. Jaeger, C. Huber und B. Seliger.** 1999. Gene transfer of the Co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2 enhances the immunogenicity of human renal cell carcinoma to a different extent. *Scand J Immunol* 50:242.
- Jung, D., E. Jaeger, S. Cayeux, T. Blankenstein, C. Hilmes, J. Karbach, U. Moebius, A. Knuth, C. Huber und B. Seliger.** 1998. Strong immunogenic potential of a B7 retroviral expression vector: generation of HLA-B7-restricted CTL response against selectable marker genes. *Hum Gene Ther* 9:53.
- Kaech, S. M., E. J. Wherry und R. Ahmed.** 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2:251.
- Kane, L. P. und A. Weiss.** 2003. The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3. *Immunol Rev* 192:7.
- Kaufman, H. L., W. Conkright, J. Divito, Jr., H. Horig, R. Kaleya, D. Lee, S. Mani, D. Panicali, L. Rajdev, T. S. Ravikumar, S. Wise-Campbell und M. J. Surhland.** 2000. A phase I trial of intra lesional RV-B7.1 vaccine in the treatment of malignant melanoma. *Hum Gene Ther* 11:1065.

- Kaufmann, H., J. E. Bailey und M. Fussenegger.** 2001. Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 1:194.
- Kellner, R., R. Lichtenfels, D. Atkins, J. Bukur, A. Ackermann, J. Beck, W. Brenner, S. Melchior und B. Seliger.** 2002. Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics* 2:1743.
- Kerkmann-Tucek, A., G. A. Banat, B. Cochlovius und M. Zoller.** 1998. Antigen loss variants of a murine renal cell carcinoma: implications for tumor vaccination. *Int J Cancer* 77:114.
- Khayyamian, S., A. Hutloff, K. Buchner, M. Grafe, V. Henn, R. A. Kroczeck und H. W. Mages.** 2002. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6198.
- Kodelja, V., C. Muller, O. Politz, N. Hakij, C. E. Orfanos und S. Goerdt.** 1998. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *J Immunol* 160:1411.
- Kondo, T., M. Seike, Y. Mori, K. Fujii, T. Yamada und S. Hirohashi.** 2003. Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics* 3:1758.
- Krammer, P. H.** 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789.
- Krebs in Deutschland.** 2002. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken.
- Krummel, M. F. und M. M. Davis.** 2002. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol* 14:66.
- Kugler, A., G. Stuhler, P. Walden, G. Zoller, A. Zobywalski, P. Brossart, U. Trefzer, S. Ullrich, C. A. Muller, V. Becker, A. J. Gross, B. Hemmerlein, L. Kanz, G. A. Muller und R. H. Ringert.** 2000. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 6:332.
- Kühlcke, K., B. Fehse, A. Schilz, S. Loges, C. Lindemann, F. Ayuk, F. Lehmann, N. Stutte, A. A. Fauser, A. R. Zander und H. G. Eckert.** 2002. Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels. *Mol Ther* 5:473.
- Kusumoto, M., S. Umeda, A. Ikubo, Y. Aoki, O. Tawfik, R. Oben, S. Williamson, W. Jewell und T. Suzuki.** 2001. Phase 1 clinical trial of irradiated autologous melanoma cells adenovirally transduced with human GM-CSF gene. *Cancer Immunol Immunother* 50:373.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.

- Lambert, L. A., G. R. Gibson, M. Maloney und R. J. Barth, Jr.** 2001. Equipotent generation of protective antitumor immunity by various methods of dendritic cell loading with whole cell tumor antigens. *J Immunother* 24:232.
- Lamers, C. H., R. A. Willemsen, B. A. Luiders, R. Debets und R. L. Bolhuis.** 2002. Protocol for gene transduction and expansion of human T lymphocytes for clinical immunogene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 9:613.
- Larsen, M. R., G. L. Sorensen, S. J. Fey, P. M. Larsen und P. Roepstorff.** 2001. Phosphoproteomics: evaluation of the use of enzymatic dephosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis. *Proteomics* 1:223.
- Laufs, S., C. Baum und S. Fruehauf.** 2002. Transplantation of human hematopoietic progenitor cells transduced with a retroviral vector containing the human multidrug-resistance-1 gene for myeloprotective gene therapy. *Transplant Proc* 34:2325.
- Lee, K. M., E. Chuang, M. Griffin, R. Khattri, D. K. Hong, W. Zhang, D. Straus, L. E. Samelson, C. B. Thompson und J. A. Bluestone.** 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282:2263.
- Lee, K. P., C. Taylor, B. Petryniak, L. A. Turka, C. H. June und C. B. Thompson.** 1990. The genomic organization of the CD28 gene. Implications for the regulation of CD28 mRNA expression and heterogeneity. *J Immunol* 145:344.
- Lee, S. J., Y. Hori, J. T. Groves, M. L. Dustin und A. K. Chakraborty.** 2002. Correlation of a dynamic model for immunological synapse formation with effector functions: two pathways to synapse formation. *Trends Immunol* 23:492.
- Leo, A. und B. Schraven.** 2001. Adapters in lymphocyte signalling. *Curr Opin Immunol* 13:307.
- Li, C., Z. Chen, Z. Xiao, X. Wu, X. Zhan, X. Zhang, M. Li, J. Li, X. Feng, S. Liang, P. Chen und J. Y. Xie.** 2003a. Comparative proteomics analysis of human lung squamous carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 309:253.
- Li, M., S. You und X. Liao.** 1998. [Experimental study of anti-tumor immunity induced by B7 vaccine of a highly malignant murine leukemic T cell line (L615)]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 19:230.
- Li, M. J., G. Bauer, A. Michienzi, J. K. Yee, N. S. Lee, J. Kim, S. Li, D. Castanotto, J. Zaia und J. J. Rossi.** 2003b. Inhibition of HIV-1 infection by lentiviral vectors expressing Pol III-promoted anti-HIV RNAs. *Mol Ther* 8:196.
- Li, Q., D. P. Normolle, D. M. Sayre, X. Zeng, R. Sun, G. Jiang, B. D. Redman und A. E. Chang.** 2000. Immunological effects of BCG as an adjuvant in autologous tumor vaccines. *Clin Immunol* 94:64.
- Li, Z., J. Dullmann, B. Schiedlmeier, M. Schmidt, C. von Kalle, J. Meyer, M. Forster, C. Stocking, A. Wahlers, O. Frank, W. Ostertag, K. Kuhlcke, H. G. Eckert, B. Fehse und C. Baum.** 2002. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296:497.

- Liang, L. und W. C. Sha.** 2002. The right place at the right time: novel B7 family members regulate effector T cell responses. *Curr Opin Immunol* 14:384.
- Liang, W., H. Wang, T. M. Sun, W. Q. Yao, L. L. Chen, Y. Jin, C. L. Li und F. J. Meng.** 2003. Application of autologous tumor cell vaccine and NDV vaccine in treatment of tumors of digestive tract. *World J Gastroenterol* 9:495.
- Lichtenfels, R., A. Ackermann, R. Kellner und B. Seliger.** 2001. Mapping and expression pattern analysis of key components of the major histocompatibility complex class I antigen processing and presentation pathway in a representative human renal cell carcinoma cell line. *Electrophoresis* 22:1801.
- Lichtenfels, R., R. Kellner, D. Atkins, J. Bukur, A. Ackermann, J. Beck, W. Brenner, S. Melchior und B. Seliger.** 2003. Identification of metabolic enzymes in renal cell carcinoma utilizing PROTEOMEX analyses. *Biochim Biophys Acta* 1646:21.
- Lin, X., A. O'Mahony, Y. Mu, R. Geleziunas und W. C. Greene.** 2000. Protein kinase C-theta participates in NF-kappaB activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of IkappaB kinase beta. *Mol Cell Biol* 20:2933.
- Lindl, T. und B. Bauer.** 1993. *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Ling, V., P. W. Wu, H. F. Finnerty, K. M. Bean, V. Spaulding, L. A. Fouser, J. P. Leonard, S. E. Hunter, R. Zollner, J. L. Thomas, J. S. Miyashiro, K. A. Jacobs und M. Collins.** 2000. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J Immunol* 164:1653.
- Liu, X., X. F. Bai, J. Wen, J. X. Gao, J. Liu, P. Lu, Y. Wang, P. Zheng und Y. Liu.** 2001. B7H costimulates clonal expansion of, and cognate destruction of tumor cells by, CD8(+) T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 194:1339.
- Liu, X., L. Zhang, M. Zhang, Y. Ma, X. Xu und Y. Cai.** 2000. Co-modification of IL-2-TNF alpha fusion gene and B7.1 gene to murine breast tumor cells leads to improved tumor rejection and vaccine effect. *Chin Med J (Engl)* 113:167.
- Livingston, B. D., M. Newman, C. Crimi, D. McKinney, R. Chesnut und A. Sette.** 2001. Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines. *Vaccine* 19:4652.
- Lottspeich, F.** 1999. Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 38:2476.
- Ma, X. J., R. Salunga, J. T. Tuggle, J. Gaudet, E. Enright, P. McQuary, T. Payette, M. Pistone, K. Stecker, B. M. Zhang, Y. X. Zhou, H. Varnholt, B. Smith, M. Gadd, E. Chatfield, J. Kessler, T. M. Baer, M. G. Erlander und D. C. Sgroi.** 2003. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5974.
- Malik, P., W. J. Krall, X. J. Yu, C. Zhou und D. B. Kohn.** 1995. Retroviral-mediated gene expression in human myelomonocytic cells: a comparison of hematopoietic cell promoters to viral promoters. *Blood* 86:2993.

- Mandelbrot, D. A., M. A. Oosterwegel, K. Shimizu, A. Yamada, G. J. Freeman, R. N. Mitchell, M. H. Sayegh und A. H. Sharpe.** 2001. B7-dependent T-cell costimulation in mice lacking CD28 and CTLA4. *J Clin Invest* 107:881.
- Mann, M. und O. N. Jensen.** 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 21:255.
- Märten, A., D. Flieger, S. Renoth, S. Weineck, P. Albers, M. Compes, B. Schottker, C. Ziske, S. Engelhart, P. Hanfland, L. Krizek, C. Faber, A. von Ruecker, S. Muller, T. Sauerbruch und I. G. Schmidt-Wolf.** 2002. Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. *Cancer Immunol Immunother* 51:637.
- Matteucci, D., A. Poli, P. Mazzetti, S. Sozzi, F. Bonci, P. Isola, L. Zaccaro, S. Giannecchini, M. Calandrella, M. Pistello, S. Specter und M. Bendinelli.** 2000. Immunogenicity of an anti-clade B feline immunodeficiency fixed-cell virus vaccine in field cats. *J Virol* 74:10911.
- Matulonis, U., C. Dosiou, G. Freeman, C. Lamont, P. Mauch, L. M. Nadler und J. D. Griffin.** 1996. B7-1 is superior to B7-2 costimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7-1 and B7-2 are functionally distinct. *J Immunol* 156:1126.
- Mazanet, M. M. und C. C. Hughes.** 2002. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol* 169:3581.
- McManus, M. T., B. B. Haines, C. P. Dillon, C. E. Whitehurst, L. van Parijs, J. Chen und P. A. Sharp.** 2002. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J Immunol* 169:5754.
- Mejean, A., S. Oudard und N. Thiounn.** 2003. Prognostic factors of renal cell carcinoma. *J Urol* 169:821.
- Meyer, G. C., R. Batrla, W. Rudy, S. C. Meuer, D. Wallwiener, B. Guckel und U. Moebius.** 1999. Potential of CD80-transfected human breast carcinoma cells to induce peptide-specific T lymphocytes in an allogeneic human histocompatibility leukocyte antigens (HLA)-A2.1+-matched situation. *Cancer Gene Ther* 6:282.
- Mishell, B. B. und S. M. Shiigi.** 1980. *Selected methods in cellular immunology*. W.H. Freeman, New York.
- Moch, H., T. Gasser, M. B. Amin, J. Torhorst, G. Sauter und M. J. Mihatsch.** 2000. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer* 89:604.
- Mosca, P. J., H. K. Lyerly, C. D. Ching, A. C. Hobeika, T. M. Clay und M. A. Morse.** 2003. Proteomics for monitoring immune responses to cancer vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 5:39.
- Mosmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55.

- Motzer, R. J., N. H. Bander und D. M. Nanus.** 1996. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 335:865.
- Motzer, R. J. und P. Russo.** 2000. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 163:408.
- Muszynski, K. W., D. Thompson, C. Hanson, R. Lyons, A. Spadaccini und S. K. Russett.** 2000. Growth factor-independent proliferation of erythroid cells infected with Friend spleen focus-forming virus is protein kinase C dependent but does not require Ras-GTP. *J Virol* 74:8444.
- Nagasaka, Y., M. Fijimoto, H. Arai und K. Nakamura.** 2002. Inhibition of heat-induced phosphorylation of stathmin by the bioflavonoid quercetin. *Electrophoresis* 23:670.
- Najafian, N. und S. J. Khoury.** 2003. T cell costimulatory pathways: blockade for autoimmunity. *Expert Opin Biol Ther* 3:227.
- Nakaseko, C., S. Miyatake, T. Iida, S. Hara, R. Abe, H. Ohno, Y. Saito und T. Saito.** 1999. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) engagement delivers an inhibitory signal through the membrane-proximal region in the absence of the tyrosine motif in the cytoplasmic tail. *J Exp Med* 190:765.
- Nelson, W. G., J. W. Simons, B. Mikhak, J. F. Chang, A. M. DeMarzo, M. A. Carducci, M. Kim, C. E. Weber, A. A. Baccala, M. A. Goeman, S. M. Clift, D. G. Ando, H. I. Levitsky, L. K. Cohen, M. G. Sanda, R. C. Mulligan, A. W. Partin, H. B. Carter, S. Piantadosi und F. F. Marshall.** 2000. Cancer cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer as vaccines for the treatment of genitourinary malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 46:S67.
- Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg und D. Schadendorf.** 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4:328.
- Neumann, E., A. Engelsberg, J. Decker, S. Storkel, E. Jaeger, C. Huber und B. Seliger.** 1998. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res* 58:4090.
- Nguyen, X. D., H. Eichler, A. Dugrillon, C. Piechaczek, M. Braun und H. Kluter.** 2003. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. *J Immunol Methods* 275:57.
- Nyman, T. A., A. Rosengren, S. Syrakki, T. P. Pellinen, K. Rautajoki und R. Lahesmaa.** 2001. A proteome database of human primary T helper cells. *Electrophoresis* 22:4375.
- Oh, S., J. W. Hodge, J. D. Ahlers, D. S. Burke, J. Schlom und J. A. Berzofsky.** 2003. Selective induction of high avidity CTL by altering the balance of signals from APC. *J Immunol* 170:2523.
- Oosterwijk-Wakka, J. C., D. M. Tiemessen, I. Bleumer, I. J. de Vries, W. Jongmans, G. J. Adema, F. M. Debruyne, P. H. de Mulder, E. Oosterwijk und P. F. Mulders.** 2002. Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells

- pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2: a phase 1 study. *J Immunother* 25:500.
- Pantuck, A. J., A. Zisman und A. Beldegrun.** 2001. Gene and immune therapy for renal cell carcinoma. *Int J Urol* 8:S1.
- Paradis, T. J., E. Floyd, J. Burkwit, S. H. Cole, B. Brunson, E. Elliott, S. Gilman und R. P. Gladue.** 2001. The anti-tumor activity of anti-CTLA-4 is mediated through its induction of IFN gamma. *Cancer Immunol Immunother* 50:125.
- Pardoll, D. M.** 2002. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2:227.
- Parkhurst, M. R., M. L. Salgaller, S. Southwood, P. F. Robbins, A. Sette, S. A. Rosenberg und Y. Kawakami.** 1996. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J Immunol* 157:2539.
- Parmiani, G., C. Castelli, P. Dalerba, R. Mortarini, L. Rivoltini, F. M. Marincola und A. Anichini.** 2002. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* 94:805.
- Patientencharta.** 1999. Gesundheitsministerkonferenz. Berlin.
- Patientenrechte in Deutschland.** 2003. Bundesministerium für Gesundheit und Bundesministerium für Justiz. Berlin.
- Paul-Ehrlich-Institut und Bundesärztekammer.** 2003. Gemeinsame Pressemitteilungen. Langen. 30.09.02, 22.11.02, 15.01.03, 07.02.03.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy und J. S. Cottrell.** 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551.
- Plautz, G. E., R. M. Bukowski, A. C. Novick, E. A. Klein, E. D. Kursh, T. E. Olencki, R. J. Yetman, A. Pienkny, K. Sandstrom und S. Shu.** 1999. T-cell adoptive immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma. *Urology* 54:617.
- Pohla, H., B. Frankenberger, B. Stadlbauer, R. Oberneder, A. Hofstetter, G. Willimsky, A. Pezzutto, B. Dorken, T. Blankenstein und D. J. Schendel.** 2000. Allogeneic vaccination for renal cell carcinoma: development and monitoring. *Bone Marrow Transplant* 25 Suppl 2:S83.
- Poluri, A., M. V. Maanen und R. E. Sutton.** 2003. Genetic therapy for HIV/AIDS. *Expert Opin Biol Ther* 3:951.
- Raes, G., J. Van Ginderachter, Y. Q. Liu, L. Brys, K. Thielemans, P. De Baetselier und A. Geldhof.** 1998. Active antitumor immunotherapy, with or without B7-mediated costimulation, increases tumor progression in an immunogenic murine T cell lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother* 45:257.

- Renkvist, N., C. Castelli, P. F. Robbins und G. Parmiani.** 2001. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 50:3.
- Ringhoffer, M. und J. E. Gschwend.** 2002. [Specific cellular immunotherapy of renal cell carcinoma. Current status and prospects]. *Urologe A* 41:249.
- Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser und G. Schuler.** 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 196:137.
- Rudd, C. E., M. Martin und H. Schneider.** 2002. CTLA-4 negative signaling via lipid rafts: A new perspective. *Sci STKE* 2002:E18.
- Sadelain, M., I. Riviere und R. Brentjens.** 2003. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 3:35.
- Saito, T. und S. Yamasaki.** 2003. Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol Rev* 192:143.
- Salgia, R., T. Lynch, A. Skarin, J. Lucca, C. Lynch, K. Jung, F. S. Hodi, M. Jaklitsch, S. Mentzer, S. Swanson, J. Lukanich, R. Bueno, J. Wain, D. Mathisen, C. Wright, P. Fidias, D. Donahue, S. Clift, S. Hardy, D. Neuberg, R. Mulligan, I. Webb, D. Sugarbaker, M. Mihm und G. Dranoff.** 2003. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 21:624.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe und J. A. Bluestone.** 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431.
- Salter, R. D. und P. Cresswell.** 1986. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *Embo J* 5:943.
- Sambrook, J. und D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Santra, S., D. H. Barouch, S. S. Jackson, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, M. A. Lifton, A. H. Sharpe und N. L. Letvin.** 2000. Functional equivalency of B7-1 and B7-2 for costimulating plasmid DNA vaccine-elicited CTL responses. *J Immunol* 165:6791.
- Schendel, D. J., B. Frankenberger, P. Jantzer, S. Cayeux, E. Nobetaner, G. Willimsky, B. Maget, H. Pohla und T. Blankenstein.** 2000. Expression of B7.1 (CD80) in a renal cell carcinoma line allows expansion of tumor-associated cytotoxic T lymphocytes in the presence of an alloresponse. *Gene Ther* 7:2007.
- Schlom, J., H. Sabzevari, D. W. Grosenbach und J. W. Hodge.** 2003. A triad of costimulatory molecules synergize to amplify T-cell activation in both vector-based and vector-infected dendritic cell vaccines. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 31:193.

- Schneider, H. und C. E. Rudd.** 2000. Tyrosine phosphatase SHP-2 binding to CTLA-4: absence of direct YVKM/YFIP motif recognition. *Biochem Biophys Res Commun* 269:279.
- Schnyder, J. und M. Baggiolini.** 1978. Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated and nonstimulated macrophages. *J Exp Med* 148:435.
- Schuler, G., B. Schuler-Thurner und R. M. Steinman.** 2003. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15:138.
- Schwartz, J. C., X. Zhang, S. G. Nathenson und S. C. Almo.** 2002. Structural mechanisms of costimulation. *Nat Immunol* 3:427.
- Seed, B.** 1983. Purification of genomic sequences from bacteriophage libraries by recombination and selection in vivo. *Nucleic Acids Res* 11:2427.
- Seigne, J., J. Turner, J. Diaz, J. Hackney, J. Pow-Sang, M. Helal, J. Lockhart und H. Yu.** 1999. A feasibility study of gene gun mediated immunotherapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 162:1259.
- Seki, N., A. D. Brooks, C. R. Carter, T. C. Back, E. M. Parsonneault, M. J. Smyth, R. H. Wilttrout und T. J. Sayers.** 2002. Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas ligand-mediated lysis in vitro, but cause tumor regression in vivo in the absence of perforin. *J Immunol* 168:3484.
- Seliger, B. und K. Kronfeld.** 2003. *Therapeutic vaccination with B7-modified allogeneic tumor cells and GM-CSF as adjuvant in patients with metastatic renal cell cancer. a pilot study.* III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Johannes Gutenberg-University, Mainz.
- Seliger, B., M. J. Maeurer und S. Ferrone.** 2000. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 21:455.
- Seliger, B., M. Menig, R. Lichtenfels, D. Atkins, J. Bukur, T. M. Halder, M. Kersten, A. Harder, A. Ackermann, J. Beck, B. Muehlenweg, W. Brenner, S. Melchior, R. Kellner und F. Lottspeich.** 2003. Identification of markers for the selection of patients undergoing renal cell carcinoma-specific immunotherapy. *Proteomics* 3:979.
- Selvakumar, A., B. K. Mohanraj, R. L. Eddy, T. B. Shows, P. C. White und B. Dupont.** 1992. Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B-lymphocyte activation antigen B7. *Immunogenetics* 36:175.
- Shankar, P., J. Schlom und J. W. Hodge.** 2001. Enhanced activation of rhesus T cells by vectors encoding a triad of costimulatory molecules (B7-1, ICAM-1, LFA-3). *Vaccine* 20:744.
- Sharpe, A. H. und G. J. Freeman.** 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2:116.
- Simon, R., M. Mirlacher und G. Sauter.** 2003. Tissue microarrays in cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 3:421.
- Simons, J. W., E. M. Jaffee, C. E. Weber, H. I. Levitsky, W. G. Nelson, M. A. Carducci, A. J. Lazenby, L. K. Cohen, C. C. Finn, S. M. Clift, K. M. Hauda, L. A. Beck, K. M.**

- Leiferman, A. H. Owens, Jr., S. Piantadosi, G. Dranoff, R. C. Mulligan, D. M. Pardoll und F. F. Marshall.** 1997. Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Res* 57:1537.
- Singer, C. A., X. A. Figueroa-Masot, R. H. Batchelor und D. M. Dorsa.** 1999. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* 19:2455.
- Sivanandham, M., P. Shaw, S. F. Bernik, E. Paoletti und M. K. Wallack.** 1998. Colon cancer cell vaccine prepared with replication-deficient vaccinia viruses encoding B7.1 and interleukin-2 induce antitumor response in syngeneic mice. *Cancer Immunol Immunother* 46:261.
- Slansky, J. E., F. M. Rattis, L. F. Boyd, T. Fahmy, E. M. Jaffee, J. P. Schneck, D. H. Margulies und D. M. Pardoll.** 2000. Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex. *Immunity* 13:529.
- Sobel, A.** 1991. Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends Biochem Sci* 16:301.
- Soltys, S. G., G. Shi, R. Tibshirani, A. J. Giaccia, A. C. Koong und Q. Le.** 2003. The use of plasma SELDI-TOF MS proteomic patterns for detection of head and neck squamous cell cancers (HNSCC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57:S202.
- Stanislowski, T., R. H. Voss, C. Lotz, E. Sadovnikova, R. A. Willemsen, J. Kuball, T. Ruppert, R. L. Bolhuis, C. J. Melief, C. Huber, H. J. Stauss und M. Theobald.** 2001. Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat Immunol* 2:962.
- Strausberg, R. L., E. A. Feingold, L. H. Grouse, J. G. Derge, R. D. Klausner, F. S. Collins, L. Wagner, C. M. Shenmen, G. D. Schuler, S. F. Altschul, B. Zeeberg, K. H. Buetow, C. F. Schaefer, N. K. Bhat, R. F. Hopkins, H. Jordan, T. Moore, S. I. Max, J. Wang, F. Hsieh, L. Diatchenko, K. Marusina, A. A. Farmer, G. M. Rubin, L. Hong, M. Stapleton, M. B. Soares, M. F. Bonaldo, T. L. Casavant, T. E. Scheetz, M. J. Brownstein, T. B. Usdin, S. Toshiyuki, P. Carninci, C. Prange, S. S. Raha, N. A. Loquellano, G. J. Peters, R. D. Abramson, S. J. Mullahy, S. A. Bosak, P. J. McEwan, K. J. McKernan, J. A. Malek, P. H. Gunaratne, S. Richards, K. C. Worley, S. Hale, A. M. Garcia, L. J. Gay, S. W. Hulyk, D. K. Villalon, D. M. Muzny, E. J. Sodergren, X. Lu, R. A. Gibbs, J. Fahey, E. Helton, M. Kettman, A. Madan, S. Rodrigues, A. Sanchez, M. Whiting, A. C. Young, Y. Shevchenko, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, J. W. Touchman, E. D. Green, M. C. Dickson, A. C. Rodriguez, J. Grimwood, J. Schmutz, R. M. Myers, Y. S. Butterfield, M. I. Krzywinski, U. Skalska, D. E. Smailus, A. Schnerch, J. E. Schein, S. J. Jones und M. A. Marra.** 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16899.
- Suh, W. K., B. U. Gajewska, H. Okada, M. A. Gronski, E. M. Bertram, W. Dawicki, G. S. Duncan, J. Bukczynski, S. Plyte, A. Elia, A. Wakeham, A. Itie, S. Chung, J. Da Costa, S. Arya, T. Horan, P. Campbell, K. Gaida, P. S. Ohashi, T. H. Watts, S. K. Yoshinaga, M. R. Bray, M. Jordana und T. W. Mak.** 2003. The B7 family member B7-H3

- preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol* 4:899.
- Sullenger, B. A. und E. Gilboa.** 2002. Emerging clinical applications of RNA. *Nature* 418:252.
- Sun, X., M. Vale, E. Leung, J. R. Kanwar, R. Gupta und G. W. Krissansen.** 2003. Mouse B7-H3 induces antitumor immunity. *Gene Ther* 10:1728.
- Taff, R. und M. Sitkovsky.** 1994. Granule enzyme exocytosis assay for cytotoxic T lymphocyte activation. Assay for lactate dehydrogenase to measure granule release by damaged cells. In *Current Protocols in Immunology*, Vol. Vol.1. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, und W. Strober, eds. John Wiley & Sons, New York, p. 3.16.1.
- Tamarit, A., J. Alberola, M. J. Galindo und D. Navarro.** 2002. Application of a 5-bromo-2'-deoxyuridine ELISA for measuring the lymphoproliferative response to human cytomegalovirus in HIV-1-infected patients. *J Virol Methods* 105:247.
- Tani, K., Y. Nakazaki, H. Hase, K. Takahashi, M. Azuma, J. Ohata, R. Kitamura, F. Komine, M. Oiwa, A. Masunaga, T. Maekawa, N. Satoh, D. Adachi, Y. Soda, U. Machida, M. Endo, T. Yamazaki, K. Watari, A. Tojo, N. Yamashita, S. Tomikawa, M. Eriguchi, H. Hamada, Y. Wakumoto, K. Hanazawa und K. Okumura.** 2000. Progress reports on immune gene therapy for stage IV renal cell cancer using lethally irradiated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced autologous renal cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 46:S73.
- Tao, G., J. Hu, H. Zou, Q. Lin, F. Liu, Y. Wu und Q. Sun.** 2001. Therapeutic antitumor response to cervical cancer in mice immunized with U14 vaccines transfected with costimulatory B7 gene. *Chin Med J (Engl)* 114:623.
- Thiede, B., F. Siejak, C. Dimmler, P. R. Jungblut und T. Rudel.** 2000. A two dimensional electrophoresis database of a human Jurkat T-cell line. *Electrophoresis* 21:2713.
- Thornburg, C., D. Boczkowski, E. Gilboa und S. K. Nair.** 2000. Induction of cytotoxic T lymphocytes with dendritic cells transfected with human papillomavirus E6 and E7 RNA: implications for cervical cancer immunotherapy. *J Immunother* 23:412.
- Thumann, P., I. Moc, J. Humrich, T. Berger, E. S. Schultz, G. Schuler und L. Jenne.** 2003. Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *J Immunol Methods* 277:1.
- Turner, B., C. Roder, D. Dieckmann, M. Heuer, M. Kruse, A. Glaser, P. Keikavoussi, E. Kampgen, A. Bender und G. Schuler.** 1999. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 223:1.
- Tough, D. F. und J. Sprent.** 1996. Measurement of T and B cell turnover with BrdU. In *Current Protocols in Immunology*, Vol. Vol.1. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, und W. Strober, eds. John Wiley & Sons, New York, p. 4.7.

- Trarbach, T., S. Greifenberg, W. Bardenheuer, A. Elmaagacli, H. Hirche, M. Flasshove, S. Seeber und T. Moritz.** 2000. Optimized retroviral transduction protocol for human progenitor cells utilizing fibronectin fragments. *Cytotherapy* 2:429.
- van der Meer, J. W., D. Bulterman, T. L. van Zwet, I. Elzenga-Claasen und R. van Furth.** 1978. Culture of mononuclear phagocytes on a teflon surface to prevent adherence. *J Exp Med* 147:271.
- van der Merwe, P. A.** 2002. Formation and function of the immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 14:293.
- van Elsas, A., R. P. Suttmuller, A. A. Hurwitz, J. Ziskin, J. Villasenor, J. P. Medema, W. W. Overwijk, N. P. Restifo, C. J. Melief, R. Offringa und J. P. Allison.** 2001. Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J Exp Med* 194:481.
- Van Ginderachter, J. A., Y. Liu, A. B. Geldhof, L. Brijs, K. Thielemans, P. De Baetselier und G. Raes.** 2000. B7-1, IFN gamma and anti-CTLA-4 co-operate to prevent T-cell tolerization during immunotherapy against a murine T-lymphoma. *Int J Cancer* 87:539.
- Veelken, H., D. Re, P. Kulmburg, F. M. Rosenthal, A. Mackensen, R. Mertelsmann und A. Lindemann.** 1996. Systematic evaluation of chimeric marker genes on dicistronic transcription units for regulated expression of transgenes in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 7:1827.
- Verhoeven, N. M., J. H. Huck, B. Roos, E. A. Struys, G. S. Salomons, A. C. Douwes, M. S. van der Knaap und C. Jakobs.** 2001. Transaldolase deficiency: liver cirrhosis associated with a new inborn error in the pentose phosphate pathway. *Am J Hum Genet* 68:1086.
- Vlahou, A., C. Laronga, L. Wilson, B. Gregory, K. Fournier, D. McGaughey, R. R. Perry, G. L. Wright, Jr. und O. J. Semmes.** 2003. A Novel Approach Toward Development of a Rapid Blood Test for Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 4:203.
- Vogelzang, N. J. und W. M. Stadler.** 1998. Kidney cancer. *Lancet* 352:1691.
- von Mehren, M., P. Arlen, J. Gulley, A. Rogatko, H. S. Cooper, N. J. Meropol, R. K. Alpaugh, M. Davey, S. McLaughlin, M. T. Beard, K. Y. Tsang, J. Schlom und L. M. Weiner.** 2001. The influence of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and prior chemotherapy on the immunological response to a vaccine (ALVAC- CEA B7.1) in patients with metastatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:1181.
- von Mehren, M., P. Arlen, K. Y. Tsang, A. Rogatko, N. Meropol, H. S. Cooper, M. Davey, S. McLaughlin, J. Schlom und L. M. Weiner.** 2000. Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 6:2219.
- Wallin, J. J., L. Liang, A. Bakardjiev und W. C. Sha.** 2001. Enhancement of CD8+ T cell responses by ICOS/B7h costimulation. *J Immunol* 167:132.

- Wang, J., T. Nakamoto, Y. Kasaoka, T. Usui und H. Hamada.** 2000a. Anti-tumor effect of murine renal cell carcinoma cells genetically modified to express B7-1 combined with cytokine secreting fibroblasts. *Hiroshima J Med Sci* 49:73.
- Wang, S., G. Zhu, A. I. Chapoval, H. Dong, K. Tamada, J. Ni und L. Chen.** 2000b. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* 96:2808.
- Wang, X. Y., L. Kazim, E. A. Repasky und J. R. Subjeck.** 2001. Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J Immunol* 166:490.
- Weber, G., D. Heck, R. R. Bartlett und K. Nixdorff.** 1992. Modulation of effects of lipopolysaccharide on macrophages by a major outer membrane protein of *Proteus mirabilis* as measured in a chemiluminescence assay. *Infect Immun* 60:1069.
- Weijtsens, M. E., E. H. Hart und R. L. Bolhuis.** 2000. Functional balance between T cell chimeric receptor density and tumor associated antigen density: CTL mediated cytolysis and lymphokine production. *Gene Ther* 7:35.
- Wells, S. I., B. J. Aronow, T. M. Wise, S. S. Williams, J. A. Couget und P. M. Howley.** 2003. Transcriptome signature of irreversible senescence in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7093.
- Widney, D., W. J. Boscardin, A. Kasravi und O. Martinez-Maza.** 2003. Expression and function of CD28 on Epstein-Barr virus-positive B cell lines and AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *Tumour Biol* 24:82.
- Wittekind, C., H. J. Meyer und F. Bootz.** 2002. *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. Springer, Berlin (u.a.).
- Wollenberg, B., S. Lang, T. Friess, K. Naujoks, A. Mayer, E. Kastenbauer und R. Zeidler.** 1999. [Induction of antitumor immune response in the mouse model after vaccination with B7.1 expressing tumor cells]. *Laryngorhinootologie* 78:36.
- Wong-Staal, F., E. M. Poeschla und D. J. Looney.** 1998a. A controlled, Phase 1 clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA. *Hum Gene Ther* 9:2407.
- Wong-Staal, F., M. Yu, O. Yamada, J. O. Ojwang, M. Leavitt und A. Ho.** 1998b. HIV-specific ribozymes. Patent US5811275.
- Wu, R. S., J. J. Kobie, D. G. Besselsen, T. C. Fong, V. D. Mack, J. A. McEarchern und E. T. Akporiaye.** 2001. Comparative analysis of IFN-gamma B7.1 and antisense TGF-beta gene transfer on the tumorigenicity of a poorly immunogenic metastatic mammary carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 50:229.
- Xiao, X. Y., Y. Tang, X. P. Wei und D. C. He.** 2003. A preliminary analysis of non-small cell lung cancer biomarkers in serum. *Biomed Environ Sci* 16:140.
- Yamagata, A., D. B. Kristensen, Y. Takeda, Y. Miyamoto, K. Okada, M. Inamatsu und K. Yoshizato.** 2002. Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. *Proteomics* 2:1267.

- Yanagisawa, K., Y. Shyr, B. J. Xu, P. P. Massion, P. H. Larsen, B. C. White, J. R. Roberts, M. Edgerton, A. Gonzalez, S. Nadaf, J. H. Moore, R. M. Caprioli und D. P. Carbone.** 2003. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 362:433.
- Yang, H., M. M. Slupska, Y. F. Wei, J. H. Tai, W. M. Luther, Y. R. Xia, D. M. Shih, J. H. Chiang, C. Baikalov, S. Fitz-Gibbon, I. T. Phan, A. Conrad und J. H. Miller.** 2000. Cloning and characterization of a new member of the Nudix hydrolases from human and mouse. *J Biol Chem* 275:8844.
- Yasui, Y., M. Pepe, M. L. Thompson, B. L. Adam, G. L. Wright, Jr., Y. Qu, J. D. Potter, M. Winget, M. Thornquist und Z. Feng.** 2003. A data-analytic strategy for protein biomarker discovery: profiling of high-dimensional proteomic data for cancer detection. *Bio-statistics* 4:449.
- Yeung, K., T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy und W. Kolch.** 1999. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401:173.
- Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, S. D. Khare, U. Sarmiento, J. Guo, T. Horan, G. Shih, M. Zhang, M. A. Coccia, T. Kohno, A. Tafuri-Bladt, D. Brankow, P. Campbell, D. Chang, L. Chiu, T. Dai, G. Duncan, G. S. Elliott, A. Hui, S. M. McCabe, S. Scully, A. Shahinian, C. L. Shaklee, G. Van und T. W. Mak.** 1999. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402:827.
- Yoshinaga, S. K., M. Zhang, J. Pistillo, T. Horan, S. D. Khare, K. Miner, M. Sonnenberg, T. Boone, D. Brankow, T. Dai, J. Delaney, H. Han, A. Hui, T. Kohno, R. Manoukian, J. S. Whoriskey und M. A. Coccia.** 2000. Characterization of a new human B7-related protein: B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS. *Int Immunol* 12:1439.
- You, Z., X. Huang, J. Hester, H. C. Toh und S. Y. Chen.** 2001. Targeting dendritic cells to enhance DNA vaccine potency. *Cancer Res* 61:3704.
- Zamoyska, R., A. Basson, A. Filby, G. Legname, M. Lovatt und B. Seddon.** 2003. The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. *Immunol Rev* 191:107.
- Zhou, P., J. Lee, P. Moore und K. M. Brasky.** 2001. High-efficiency gene transfer into rhesus macaque primary T lymphocytes by combining 32 degrees C centrifugation and CH-296-coated plates: effect of gene transfer protocol on T cell homing receptor expression. *Hum Gene Ther* 12:1843.
- Zisman, A., J. A. Wieder, A. J. Pantuck, D. H. Chao, F. Dorey, J. W. Said, B. J. Gitlitz, J. B. deKernion, R. A. Figlin und A. S. Belldegrun.** 2003. Renal cell carcinoma with tumor thrombus extension: biology, role of nephrectomy and response to immunotherapy. *J Urol* 169:909.

IX. Abkürzungen

2D	zweidimensional
A	Ampere
ABC	Antikörperbindekapaazität
AmpR	Ampicillinresistenz
AMV	Aviärer Myoblasto Virus
AP	Adapterprotein
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BrdU	5-bromo-2'-deoxy-Uridin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	codierende DNA
cfu	<i>colony forming unit</i>
CMV	Zytomegalievirus
CoA	Coenzym A
CTLA	Antigen zytotoxischer T-Zellen
CY	Indodicarbocyanin
Da	Dalton
DC	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline
DTH	<i>delayed-type-hypersensitivity</i>
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced GFP
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERK	durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Durchflusszytometer
FITC	fötales Kälberserum
FSC	Fluorescein Isothiocyanate
GFP	Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	<i>green fluorescent protein</i>
GRB	Granulozyten-Monozyten <i>colony stimulation factor</i>
GST	<i>growth factor</i> Rezeptor Protein
GTP	Glutathion-S-Transferase
GVT	Guanidintriphosphat
Gy	<i>gravt-versus-tumor</i>
HBV	Gray
HCV	Hepatitis-B Virus
HIV	Hepatitis-C Virus
HLA	<i>human immunodeficiency virus</i>
HNSCC	humanes Leukozytenantigen
HPLC	<i>head and neck squamous cell cancer</i>
HygR	<i>high pressure liquid chromatography</i>
ICAM	Hygromycinresistenz
ICOS	intrazelluläres Zelladhäsionsmolekül
	induzierbarer Costimulator

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry side</i>
JNK	c-jun N-terminale Kinasen
kb	Kilobasen
LDH	Lactatdehydrogenase
LFA	Lymphozytenfunktionsantigen
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	<i>long terminal repeats</i>
MCB	Masterzellbank
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MLTC	gemischte Lymphozyten-Tumor-Kultur
MoMuLV	moloney murine Leukämievirus
MPI	Max-Planck-Institut
MPSV	myeloproliferativer Sarkomvirus
MTP	Mikrotiterplatte
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MZ	Mainz
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
NeoR	Neomycinresistenz
NF	Nuklearfaktor
NK	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
OP	Operation
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	<i>programmed cell death</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol 3-Phosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RCC	<i>renal cell cancer</i>
Ribo	Ribozym
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SCC	Seitwärtsstreulicht
SCID	schwere kombinierte Immundefizienz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELDI	<i>surface enhanced laser desorption and ionization</i>
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>

SHP	SH2-Domäne beinhaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase
SOP	<i>standard operating procedure</i>
SV40	<i>simian virus 40</i>
TAP	Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TM	Transmembrandomäne
TMN	<i>tumor metastasis nodes</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
Ub	Ubiquitin
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
ZAP	CD3 ζ assoziiertes Protein
ZTL	zytotoxische T-Zelle (T-Lymphozyt)
Zyt	zytoplasmatische Domäne

X. Anhang

1. Klassifikation von Nierentumoren

1.1. TNM: Klinische Klassifikation

1.1.1. T-Primärtumor

- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
 T0 kein Anhalt für Primärtumor
 T1 Tumor 7,0cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
 T2 Tumor mehr als 7,0cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
 T3 Tumor breitet sich in größere Venen aus oder infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Gewebe jedoch nicht über die Gerota-Faszie hinaus
 T3a Tumor infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Gewebe jedoch nicht über die Gerota-Faszie hinaus
 T3b Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvenen oder Vena cava (einschließlich Wandbefall) unterhalb des Zwerchfells
 T3c Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena cava (einschließlich Wandbefall) oberhalb des Zwerchfells
 T4 Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus

1.1.2. N-regionäre Lymphknoten

- NX regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
 N0 keine regionären Lymphknotenmetastasen
 N1 Metastase in einem regionären Lymphknotenmetastasen
 N2 Metastase mehr als einem regionären Lymphknotenmetastasen

1.1.3. M-Fernmetastasen

- MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
 M0 keine Fernmetastasen
 M1 Fernmetastasen

1.2. G: histopathologisches Grading

- GX Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
 G0 gut differenziert
 G1 mäßig differenziert
 G3-4 schlecht differenziert / undifferenziert

1.3. Stadiengruppierung

Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IV	T4	N0, N1	M0
	jedes T	N2	M0
	jedes T	jedes N	M1

2. DNA-Sequenzen

2.1. Genkonstrukt pCMV B7-1

```

1   gacggatcgg gagatctccc gatccctcat ggtcgactct cagtacaatc tgcctctgatg ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt
101  ggaggtcgct gagt agtgcg cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc tttaggttag cgtttttgcy
201  ctgcttcgcy atgt acgggc cagatatacag cgttgacatt tagttattaa tagtaataca ttacggggtc attagttcat agcccatata
301  tggagttccg cgtt acataaa cttacggtaa atggcccgcg ttgttgaccg cccaacgacc ccgcccattt gacgtcaata atgacgtatg tccccatagt
401  aacgccaaata gggactttcc attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgccca ctgggcagta catcaagtgt atcatatgcy aagtacgccc
501  cctattgacg tcaatgacgy taaatggccc gcctggcatt atgcccgata catgacctta tgggaacttt ctacttggca gtacatctac gtattagtca
601  tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgttga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa
701  tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggaactttcca aaatgctgta acaactccgc ccatttgacg ccaatgggcy gtaggcgtgt acggtgggag
801  gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca ctgcttactg gcttatcgaa attaatcgaa ctactatag ctccacccca ttgacgtcaa
901  gagctcgatg ccactagtaa cggccgcacg tgtctggtaa ttctcgagat catggccac acacggaggc agggaacatc accatccaa gttccatacc
1001 tcaaattctt ctacgtcttg gtgctggctg gtctttctca cttctgttca cttctgttca cgtgttatcc cattgtgaaa ggaagtgaac cgtgtcctg
1101 tgggtcaaat gtttctgttg aagagctggc aaaaactcgc atctactggc aaaaaggaaa gaaatggtg ctgactatga tgtctgggga catgaatata
1201 tggcccgagt acaagaaccg gaccattttt gatataccta ataacctctc cattgtgatc ctgctctgc gccactctga cggggcaca tacyagtgtg
1301 ttgttctgaa gttgaaaaa gacgctttca agcgggaaca cctggctgaa gtgacgttat cagtcaaacg tgacttccct acacttagta tatctgactt
1401 tgaaaattca acttctaata ttagaaggta aatttgccta acctctcaga gttttccaga gcttcacctc tectggttg gaaatgaat agaattaaat
1501 gccatcaaca caacagtttc ccaagatctt gaaactgagc tctatgtggt tagcacgaaa ctggatttca atatgacaac caaccacagc ttcatgtgtc
1601 tcatcaagta tggacattta agagtgaatc agaccttcaa ctggaataca accaagcaag agcattttcc tgataacctg ctccactcct gggccattac
1701 cttaattctca gtaaatggaa ttttttgat atgctgctgt acctactgct atgcagagag atgcagagag agaaggagga atgagagatt ctgacgtcaa
1801 agtgaacgcy ctgtataaca gtgtccgcag aagcaagggy ctgaaaaagt ctgaaggtag cctcgtcat ctcttctggy atacatggat cgtggggatc
1901 atccatcaaca cttgcggcgc ctcgagcatg catctagagc aagtgccact aagtgccact ccaaccaaca aacaaaaaac cccccccccc cccccccccc
2001 caacgttatt gggcgaagcc gcttggaaat agggcgtgt gctgttctct atatgttatt tctaccacat caccgtctt ttggtgtgtg agggcccgga
2101 tcaatttctt ctacgtcttg gtgctggctg taggggtctg tccccctcgc ccaaaggaa ctgaaggtctg ttgaatgtcg gcttccctgt cgttccctgt
2201 gaagcttctt gaagacaagc aacgtctgta gcgacccctt gcagcgagcy gaaatcccc cctggtaaac ggtgctctcg cggccaaaag ccacgtgtat
2301 aagatacacg tgaagaagcy gtggttttcc tttgaaaacc agtgccagct tgtagtgtgg atagtgtgg gatggtaac aagatgattt tctccggcgc
2401 gctgaagatg gcccaagaag taccoccttg tatgggatct gatctgggcy ctcggtgcac gtgctctaca cgtgttgagt cgaagttaaa aaacgtctag
2501 gcccccgaac ccaacgggac gtggttttcc tttgaaaacc agtgccagct tgtagtgtgg gatggtaac aagatgattt tctccggcgc
2601 ctggggtgga gaggctattc ggcatactg gggcacaaac gacaatcgcy tgcctctgatg ccgcccgtgt cccgctgtca cgcacgggcy gccccgttct
2701 ttttgcgaag accgactcgt ccggtgccct gaatgaactg caggacaggy actcgtggctg atcgtggctg gccacgagcy cgttctctgt cgttccctgt
2801 ctcgagcttg tcactgaagc gggaaggagc ttgctgctat tggcggaagt cccggggcag gatctcctgt catctcactc tgcctctgcc gagaagatg
2901 ccatcatggc tgaatgcaat gggcgctcgc atacgcttga tcccgctacc tcccgctacc accaccaagc gaacatcgc atcctagcgc cagctactgc
3001 gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggtcgcgcgc agccgaactg ttccgcagcg tcaaggcgcy catgccgcgc
3101 ggcgagatca tgcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatcatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggatttca ctgactgtgc cggctgggtg
3201 tggcggacgc ctatcaaggac atagcgttgg ctaccgttga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgctt accgttatcgc
3301 cgtcccgagt tccgacgcga tgcctctcta tgcctcttct gagcaattgc cctatctcta tagtgtcacc taaatgctag agctcgtgta tcaagctcga
3401 ctgtgccttc tagt tgcag ccatctgttg tttgcccttc ccccgctgct tcccttgacc ttggaaggtg cactccact ctcttctcc atcaaaatga
3501 ggaatttga tgcattgtc tgaagtgtg tcaatttatt ctgggggtg ggtggggca ggacagcaag ggggaggtt ggaagacag tagccattct
3601 agttgtggtt tgcctcaact catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc ctgcacctct agctagact tggcgtaatc atggtcatac atgttctctg
3701 tgtgaaattg ttaactcgcct acaattccac acaactacg agcccgagc ataaagtga aaagcctggg tgccatatag tgccatgaag tcaacttaac
3801 tgcgttgcgc tcaactccgc ctttccagtc ggggaacctg tgcgtcgagc tgcaattatg aatcggccaa cgcgcgggga cgcgcgggga ggtatgtgg
3901 cgtctctccg ctactcgcct cactgactcg ctgcgctcgc tgcgttcgct cggcgagcgc gtatcagctc actcaaaagg ggtataatcc ttaaccacag
4001 aatcagggga ttaaccgga aagaacatgt gacgaaaaag ccaagaaaaa cccgcaaacg gctaaaaagg cgcgttgcgt cgtttttcc atagacctcc
4101 cccccctgac gagcatcaca aaaaatcgac ctcaagtca aggttgcgaa acccgacag actataaaga taccaggcgt tccccctctg aagctccctc
4201 gtgcgctcct ctgtttcgac cctgcgcctt accgataacc tgcctgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgttcttca atgctcacgc tttaggtatc
4301 tcaagtctgt tagtgtctt cgtctcaagc tgcgtcgtt tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcaag ccgaccgctg cgccttacc ggttaactac gtcttgagtc
4401 caacccegta agacacgact tatcgccact ggcagcagc actgtgaaca ggtattagca agcgaggtg ttaggcggtg ttagcggtg ttagcggtg
4501 tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttgc gaaaaggagt ttgtagctct ttagtccgca
4601 aacaaaccac cgtcgttagc ggtggtttt ttgtttgcaa tctgctcaga acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cttttagctc tttctacggg
4701 gctcgacgct cagtggaaagc aaaaactcac atagggatg ttggtctaga gattatcaaa aagatctctc acctagatcc ttttaaatga tttaagaagt
4801 ttttaataca tctaaagat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc atgcttaatc agtgaggac ctatctcagc gatctgtcta tttcgtcat
4901 ccatagttgc tctgactccc gtcgtgtaga taactacgat accggaagtc ttaacctctg tgaacatgta tgcacagacc tgaagatgta cgcagtaacc
5001 ggtccagatg ttaacagcaa taaccagacc agccggaagc gccagcgaca gaagtgttcc tgaacattta tccgcctcca tccagtcata taattgttgc
5101 cgggaagcta gagtgaatga ttccgcaagt aatagtttgc tgcacttgct gcaacgttgt ttgcttgctc atgcagactg ttggtgcacg cctcgtctt
5201 cattcagctc cgtt tcccaa cgtatcaagg gatgtacatg atccccatct ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttctggt cctccgactg ttgtcagaag
5301 taagtgtgcc cagagtttat cactcatggt tatggcagca ctctaatatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct ttctgtgac ttgtgactac
5401 tcaaccagat cattctgaga atagtgtat cggcgaccca gttgctctg cccggcgtca atacgggata ataccgcgc acatagacca actttaaaag
5501 tgcactgcat tggaaaaagc tcttcggggc gaaaaactct aaggtatcta cgcgtgttga gatcaaccc gatgtgcac acctcgtgac ccaactgatc
5601 ttacagatct ttaactttca ccagcgttct tgggtgagca aaaaacagaa ggcataatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacgcaa atgttgaata
5701 ctcatactct tcttttttca atattattga agcattttac agggttattg tctcatgagc ggaatcatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag
5801 ggttccgcy cacttttccc gaaaagtgc cactcgact c

```

2.2. Genkonstrukt pCMV B7-2

```

1   gacggatcgg gagatctccc gatccctcat ggtcgactct cagtacaatc tgcctctgatg ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt
101  ggaggtcgct gagt agtgcg cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc tttaggttag cgtttttgcy
201  ctgcttcgcy atgt acgggc cagatatacag cgttgacatt tagttattaa tagtaataca ttacggggtc attagttcat agcccatata
301  tggagttccg cgtt acataaa cttacggtaa atggcccgcg ttgttgaccg cccaacgacc ccgcccattt gacgtcaata atgacgtatg tccccatagt
401  aacgccaaata gggactttcc attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgccca ctgggcagta catcaagtgt atcatatgcy aagtacgccc
501  cctattgacg tcaatgacgy taaatggccc gcctggcatt atgcccgata catgacctta tgggaacttt ctacttggca gtacatctac gtattagtca
601  tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgttga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa
701  tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggaactttcca aaatgctgta acaactccgc ccatttgacg ccaatgggcy gtaggcgtgt acggtgggag
801  gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca ctgcttactg gcttatcgaa attaatcgaa ctactatag ctccacccca ttgacgtcaa
901  gagctcgatg ccactagtaa cggccgcacg tgtctggtaa ttctcgagat ctatgatata tgcataatga ggtcacagca gaagcagcca aaatggatc
1001 atggcactga gtaacattct ctttgtgatg gccttccctg tctctggtgc tgcataatga tgcctctctg tgcctctctg aagattcaag cttaattcaa tgagactgca gacctgccat
1101 gccaaatttg aaaactctca aaccaagacc tgaagtgaat agtagtattt tggcaggacc agggaaaact ggttctgaat tgcttcaact ttaggcaaga
1201 gaaatttga agtgttcat ccaagtatat gggccgcaca agttttgatt cccacagga tgaattgact cggacagttg gacctgaga cttcacaatc ttcagatata ggacaaggcy
1301 ttgtatcaat gtatcatcca tcaaaaaaag cccacagga tgaattgact cccacagatg aattctgaac tgtcagtgct tgctaaactc agtcaactct gctcttttca
1401 aatatgatac aatttctaata ataacagaaa atgtgtacat aaatttgacc tgcctatcta tacacggtta cccagaacct ccaagagatg gtgtttgtc
1501 aagaaccaa agttcaacta tcyagtatga ttgtattatg cagaaaactg aagataatg taagataatg cacaagaactg cacttttctc tatagagctt gaggaccctc
1601 ttccctgatg ttaacagcaa tatgaccatc tctgttattc tggaaaactg caaagcgcgg cttttattct ctgtctaatc ctatggaaat ggaagaagaa
1701 agctcccccc agaccacatt ccttgattat ataaatgtgg atggaaggtg aagagaccaa aaaaagagaa aaaaagagaa atagagatca tcaactggc
1801 gtagcggcct cgcaactctt ataaatgtgg tgaagacat cttcatcgca caaaaaaaca cacaacccac cacttaagtg cccccccccc cccccccccc
1901 tctgtggaag cccagcgtgt agagggccga agagggcgtg tgcctatagt ttaattctac tctcgcaaaa ggaatgaag ttctgtgaa cctctgaaga
2001 ggcgcctcga catgcatct agagggccga gcttctcccc ctctcgcaaa ggtctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa cctctgaaga
2101 aagcgccttg gaataaggcc ggtgtgcgtt tctctgcaaa ggtctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa cctctgaaga
2201 ctgactcagc attcctagg gttcttcccc ctctcgcaaa ggtctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa cctctgaaga
2301 caagcaacgt ctgtagcac ccttctcagc cagcggaagt tgcctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa cctctgaaga
2401 agcgcgaca accccagtg cactgttga gttgtagg tgcctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa cctctgaaga
2501 gaaggtaccc ccttctgag gatcgtgat ggggcctcgc tgaacgtgct ctacacgtgt tgaacagat gttgtccgcy tgcctgtgaa
2601 gggagctgtg ttttcttga aaaccacgat tgcctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa cctctgaaga
2701 tattcggcta tgcactggca caacagacaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa tgcctgtgaa cctctgaaga
2801 cctgtccggt gccctgaatg aactcgagga ggcctactgc tgcctactgc cactgtcgtg tgcctactgc cactgtcgtg tgcctactgc cactgtcgtg
2901 gaagcgggaa gggactgct gctattggcg gaagtgcgc ggcaggtact cctgtcatct cactgtcgtg tgcctactgc cactgtcgtg
3001 caatgcgcgc gctcatagc cttgatccgc caactgcctc atcgaccaa caggcgaac aactgttgc caggctcaag gcgcgcacg cgcgcacg
3101 tgtcgatcag gatgatcgtg acgaagagca tcaaggggctc aactgttgc caggctcaag gcgcgcacg cgcgcacg
3201 tgacccatg gcgatgctc cttgcgaat atcatggtg aaaaatggcy ctttctgga ttcactgact tgcctactgc tgcctactgc tgcctactgc
3301 aggaatagc cttggctacc cgtgatattg ctgaagagc tggcggtgaa ggtcgtgacc gcttactgc tgcctactgc tgcctactgc
3401 gcagatcgcc tctatcgcc tcttctgaga attgcccta tctctatgct tcaactaaat cactgtcct cactgtcct cactgtcct
3501 gccagcatac tgttttgc cctccccgc gacctggaa ggtcgtgaa ggtcgtgaa ggtcgtgaa ggtcgtgaa
3601 ttgtctgagt aggtgcatct ctattctggg ggtggggtg gggcaggaca ggaatgagc ggaatgagc ggaatgagc ggaatgagc

```

```

3701 aaactcatca atgtatctta tcatgtctgt ataccgtcga cctctagcta gagcttggcg taatcatggt catagctgtt tctgtgtga aattgttata
3801 cgctcacaaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtgcct aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact
3901 gcccgctttc cagtgcggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgtct tccgcttcc
4001 tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcgtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttata cacagaatca ggggataacg
4101 caggaaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt ttccatagg ctcgcccccc ctgacgagca
4201 tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggaactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgctg ctctcctgtt
4301 ccgacctctg cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcaatgct cactgtag gtatctcagt tcggtgtagg
4401 tcgttcgctc caagctggcg tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccgac cgtgcgcctt tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca
4501 cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtag cggtgctaca gatttctga agtgggtggc taactacggc
4601 tacactagaa ggacagtatt tggatctgct gctctgtgta agccagttac cttcgaaaaa agagttagta gctcttgatc cggcaaaaca accaccgtg
4701 gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcy cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatctttctt acggggctg acgctcagtg
4801 gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa
4901 agtatataat agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcc ttcatccata gttgctgac
5001 tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcy agaccacgc tcaccggctc cagatttata
5101 agcaataaac cagccagccg gaaggccgga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttccggga agctagagta
5201 agtagttcgc cagttaatag ttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgtcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt
5301 cccaacgatac aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtctccc gatcgttgct agaagtaagt tggccgagtt
5401 gttatcactc atgggtatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcatc
5501 tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatcac ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa
5601 aacgtttctt cgggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aacccactcg tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac
5701 tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggggcaca cggaaatgtt gaatactcat actcttctct
5801 tttcaatatt attgaagcat ttatcaggtt tattgtctca tgagcgata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat
5901 tttcccgaag agtgccacct gacgtc

```

3. SOP - Behandlung und Verabreichung des zellulären B7-Vakzins

Klinikum der Johannes Gutenberg Universität Mainz
Tumorstudienambulanz

55101 Mainz – Langenbeckstr.1 – Gebäude 302 T

**Vakzinierung von Nierenkarzinompatienten mit gentechnisch veränderten,
B7-exprimierenden allogenen Tumorzelllinien**

SOP - Behandlung und Verabreichung des zellulären B7-Vakzins

A. Material:

Vakzine:

Hersteller

Q-One Biotech Ltd, 4 Todd Campus, West of Scotland Science Park, Glasgow, UK

Identität **B7-1** Vakzin

Produkt Batch

No. 1011.01 MCB of 1257 RC B7-1 Batch P6 Cell Line

Beschriftung:

1257RCB7-1BatchP6 MCB Lot 1011.01 P10 22. November 2000 Vol 1ml, Vial X

Identität **B7-2** Vakzin

Produkt Batch

No. 1012.02 MCB of 1257 RC p56 Batch P4 Cell Line

Beschriftung:

1257RCP56BatchP4 MCB Lot 1012.02 P12 28. November 2000 Vol 1ml, Vial X

Medien und Waschlösung

MEM mit Earle's Salzen Biochrom AG Kat No F0383

DPBS von BioWhittaker Kat No BE17-512F

Kunststoffeinmalartikel

15ml Röhrchen Greiner Bio-One No 188271

10ml Pipetten Greiner Bio-One No 607180

1000µl ART Tips Molecular BioProducts No 2279

B. Lagerung

Stickstofftank Stammzelllabor III.Med.Klinik, Uniklinik Mainz

C. Ablauf

1. Bestimmung der erforderlichen Anzahl an vials

Vom Hersteller Q-One Biotech wurden für das
B7-1 Vakzin 5×10^6 Zellen pro vial und für das
B7-2 Vakzin $2,5 \times 10^6$ Zellen pro vial
abgefüllt und eingefroren.

Bei Vakzinierung mit B7-1 werden daher für eine Dosis von
 $2,5 \times 10^6$ Zellen $\frac{1}{2}$ vial,
 1×10^7 Zellen 2 vials und bei
 2×10^7 Zellen 4 vials benötigt.

Bei Vakzinierung mit B7-2 werden daher für eine Dosis von
 $2,5 \times 10^6$ Zellen 1 vial,
 1×10^7 Zellen 4 vials und bei
 2×10^7 Zellen 8 vials benötigt.

Klinikum der Johannes Gutenberg Universität Mainz
Tumorstudienzentrum
55101 Mainz – Langenbeckstr.1 – Gebäude 302 T

**Vakzinierung von Nierenkarzinompatienten mit gentechnisch veränderten,
B7-exprimierenden allogenen Tumorzelllinien**

2. Auftauen

- Nummer der Vials notieren und auf dem Patienten-Vakzin-Ablaufprotokoll vermerken
(Hinweis: die Zellen für mehrere Patienten nicht mischen !)
- Transport der Vials auf Trockeneis ins TVZ
- Vials für 1min 50sec in ein 37°C Wasserbad
- Inhalt der Vials resuspendieren in 9ml MEM (siehe A.)
- waschen des Vials mit 1ml MEM
- Zellsuspension zentrifugieren 400g 5min
- Pellet resuspendieren in 10ml MEM =>200µl für Zellzählung entnehmen
- 50µl Zellsuspension + 50µl 0.2% Trypanblau
Zellzählung 1x wiederholen
- Zellsuspension zentrifugieren 400g 5min
- Pellet aufnehmen in 10ml MEM

3. Bestrahlung

- Zellen zügig dem Transportdienst übergeben
- zügiger Transport der Zellen in die Blutbank Konservenausgabe
- Bestrahlung 6 x 30 Gy
- zügig mit dem Transportdienst zurück ins Labor

4. Verabreichung

- Zellsuspension zentrifugieren 400g 5min
- Pellet aufnehmen in 1ml DPBS (siehe A.)

Wenn der Zeitrahmen von 4 Stunden eingehalten werden konnte,
dann ist das Vakzin ist nun fertig für die s.c. Injektion.
Ansonsten wird das Vakzin verworfen.

5. Änderungen

Sollten sich verschiedene Schritte als problematisch oder in dieser Form unpraktikabel erweisen, so kann diese SOP nach ausführlicher Rücksprache mit allen Verantwortlichen geändert werden.

Diese Änderungen müssen genau dokumentiert und leicht nachvollziehbar abgelegt werden.

Klinikum der Johannes Gutenberg Universität Mainz
Tumorstudienzentrum
55101 Mainz – Langenbeckstr.1 – Gebäude 302 T

**Vakzinierung von Nierenkarzinompatienten mit gentechnisch veränderten,
B7-exprimierenden allogenen Tumorzelllinien**

Ansprechpartner:

Studienleitung	Prof. Barbara Seliger	17-6760
	Dr. Beck	17-5042
	Pieper	194-268
Studienmanagement	Fr Meinhardt	17-5160
	Fr El Kholy	17-5160
Tumorstudienzentrum	Probenannahme	17-5727
	Büro	17-5721
Konzeption SOP	Kai Kronfeld	13-33302
Blutbank Mainz	OA Frau Dr Kunz	Pieper 194-957
	Konservenausgabe	17-3221
Apotheke Uniklinik Mainz	Frau Dr Thiesen	17-5359
	Frau Sattler	17-4525
Biochrom AG Berlin	Herr Delventhal	030/779906-34
BioWhittaker Europe	Frau Sons-Brinkmann	06151/494647
		0171/9768307
Greiner Bio-One	Frau Baumstark	07022/948-0

Klinikum der Johannes Gutenberg Universität Mainz
Tumorstudienzentrum
55101 Mainz – Langenbeckstr.1 – Gebäude 302 T

**Vakzinierung von Nierenkarzinompatienten mit gentechnisch veränderten,
B7-exprimierenden allogenen Tumorzelllinien**

Patienten-Vakzin-Ablaufprotokoll

Patientendaten Datum _____
Name _____
Vorname _____ Vakzierungszyklus No _____
Geb. Datum _____
Straße _____ Zelldosis _____
Wohnort _____

Identität des Vakzins	
1257RC B7-1 Batch P6 MCB	1257RCP56 Batch P4 MCB
Lot 1011.01 P10	Lot 1012.02 P12
22 November 2000	28 November 2000
Vol 1ml	Vol 1ml
Vial _____	Vial _____

aufgetaut, gewaschen und gezählt

Zellzahl _____ Uhrzeit/Unterschrift _____

Vakzin dem Transportdienst übergeben Uhrzeit/Unterschrift _____

Vakzin in der Blutbank angenommen Uhrzeit/Unterschrift _____

Vakzin ordnungsgemäß bestrahlt 6x30 Gy:

Uhrzeit/Unterschrift _____

Vakzin dem Transportdienst übergeben Uhrzeit/Unterschrift _____

Vakzin zurück im TVZ Uhrzeit/Unterschrift _____

Zeitraumen eingehalten ?

Ja



Vakzin verabreicht

Nein



Vakzin verworfen

Uhrzeit/Unterschrift _____ Uhrzeit/Unterschrift _____

4. Liste der identifizierten Proteine der T-Zell Proteomanalyse

Protein	Funktion	Regulation	MW	pI	Genbank
Acetyl CoA Acetyltransferase 2	cytosolische AcetylCoA Thiolase Cholesterinhaushalt, Lipoproteinzusammenbau	B7-2 hoch	59,9	8,96	NCBI NP_005882
AcetylCoA Dehydrogenase	mitochondriales Enzym Fettsäurestoffwechsel	B7-2 hoch	44,3	8,13	NCBI 4557233
Apolipoprotein A1	Apoptose, HDL, Cholesterinfreisetzung, Lipidstoffwechsel	neu in B7	30,8	5,56	NCBI CAA00975
Calmodulin	stimuliert im Komplex mit Ca ²⁺ die Funktion verschiedener Enzyme wie Protein Kinasen und Phosphatasen	modifiziert	16,7	4,09	NCBI AAH1887
Cytochromoxidase VIIaL	kerncodierte Untereinheit der mitochondrialen Cytochrom C Oxidase terminale Oxidase im mitochondrialen Elektronentransport	unverändert	9,4	9,75	NCBI 4502989
EnoylCoA Hydratase	mitochondriale Fettsäure β -Oxidation	unverändert	31,4	8,34	NCBI 14286220
FLJ20580	hypothetisches Protein (Strausberg et al., 2002)	B7-2 runter	18,0	4,93	NCBI AAH10908
Glia Reifungsfaktor	fördert Differenzierung von Gehirnzellen inhibiert Tumorzellproliferation	modifiziert	16,6	5,19	NCBI AF038956
Glutathiontransferase GSTP1	Konjugation von reduziertem Glutathion	unverändert	23,2	5,44	NCBI 321138
Glyoxylase 1	katalysiert die Umsetzung von Methylglyoxal und Glutathion zu S-Lactoylglutathion - Glyoxalweg	modifiziert	20,6	5,25	NCBI 6573420

Protein	Funktion	Regulation	MW	pI	Genbank
GrpE Homolog 1	mitochondriales Protein, Cochaperon von hsp60	modifiziert	24,3	8,24	NCBI GRE_HUMAN
Hämoglobin beta	Sauerstofftransport	B7 runter	15,9	6,81	NCBI P02023
HCC-1	nukleäres, proliferationsassoziiertes, cytochininduzierbares Protein; evtl. DNA Bindung und Beeinflussung von Transkription und Translation	modifiziert	23,7	6,10	NCBI 18202440
Histon H4	zusammen mit H3 wichtige Rolle bei der Nukleosomenformation	B7-2 hoch	11,2	11,3 6	NCBI 32097
hsp27 Homolog	unbekannte Funktion	unverändert	22,8	5,98	NCBI Q96EI7
HSU93205	nukleärer Chloridionenkanal	B7 runter	26,9	5,09	NCBI AAC25675
Initiationsfaktor 5a	eukaryontische Translationsinitiation	unverändert	16,7	5,08	NCBI NM_001970
KNP-1 beta	mitochondriales Protein, unbekannte Funktion	unverändert	28,1	8,5	NCBI JC4913
MGC15429	hypothetisches Protein, Enzymdomäne (Strausberg et al., 2002)	modifiziert	25,3	6,82	NCBI 14249382
My032	mitochondriale ATP Synthase D-Kette	B7-2 runter	18,4	5,22	NCBI 12002006

Protein	Histon H4Funktion	Regulation	MW	pI	Genbank
Neuropolypeptid h3	Signaltransduktion, Raf Kinase Inhibitor	neu in B7	20,9	7,33	NCBI 913159
Nicotinamid N methyltransferase	katalysiert die Methylierung von Nicotinamid und anderen Pyridinen wichtig für die Biotransformation vieler Medikamente	B7 runter	29,6	5,56	NCBI A54060
Nudix Hydrolase nudt5	hydrolysiert verschiedene Nukleosid-Diphosphat Derivate	B7-1 runter	24,3	4,74	SWISSPROT Q9UH49
PCNA	zellzyklusabhängig reguliertes Protein (Cyclin 1) Transkriptionscoaktivator, Cofaktor DNA Polymerase δ	B7 hoch	28,8	4,57	NCBI WMHUET
PDGF Bindeprotein	unterstützt PDGFa stimuliertes Zellwachstum inhibiert mitogenen Effekt von PDGFb	fehlt in B7	20,6	8,84	NCBI AAH00684
Peroxioredoxin 3	involviert in die Redox-Regulation der Zelle schützt empfindliche Proteine vor Radikalen	unverändert	27,7	7,68	NCBI 14250063
PKC Substrat 80 k-H	Hepatocystin, ER-lokalisiert Proteinkinase C Substrat	modifiziert	59,3	4,34	NCBI 4506077
PNPP	Purin Nukleosid Phosphorylase	B7 hoch	32,1	6,45	NCBI PHHUPN
Prefoldin 5	unterdrückt transkriptionelle Aktivierung durch c-myc	B7 hoch	17,3	5,94	NCBI 14762824
Profilin 1	Aktin-abhängiger Transkriptionsfaktor	unverändert	14,9	8,47	NCBI 4826898

Protein	Funktion	Regulation	MW	pI	Genbank
ran	Signaltransduktion Ras/ERK Signalweg, GTP-Bindeprotein	unverändert	24,4	7,01	NCBI TVHUC3
rho GDI beta	Signaltransduktion, inhibiert GDP Dissoziation von rho	unverändert	23,2	5,03	NCBI 36038
ribosomales Protein pO	Ribosomenbestandteil	B7 runter	34,3	5,72	NCBI 4506667
RNA bindende Untereinheit	Signaltransduktion, RNA Bindung	modifiziert	19,8	6,33	NCBI 6005749
SMT3A	Ubiquitin-ähnliches Protein	B7-2 runter	11,6	5,32	NCBI CAA67896
Splicefaktor p32	Inhibition der Complementfunktion oder Splicefaktor genaue Funktion unbekannt	modifiziert	31,4	4,74	NCBI JT0762
Stathmin	Regulation des Mikrotubuli Filament Systems Destabilisierung von Mikrotubuli	B7 hoch	17,2	5,77	NCBI 5031851
Superoxiddismutase	zerstört Radikale	B7-2 runter	15,8	5,70	NCBI 515251
TCPI	Chaperon, beteiligt bei Aktin- und Tubulinfaltung	B7-2 hoch	60,4	6,10	NCBI A38983
Transaldolase 1	Schlüsselenzym Pentose-Phosphat-Weg	B7-1 runter	37,5	6,36	NCBI AAH18847

Protein	Funktion	Regulation	MW	pI	Genbank
Ubiquitin Proteinligase	DNA-Reparatur, Ubiquitinierung von PCNA	B7 runter	17,1	6,13	NCBI JC4894
Vimentin	gehört zur Familie der Zwischenfilamente	unverändert	53,5	5,06	NCBI 340219

5. Liste der identifizierten Proteine der T-Zell Phosphoproteomanalyse

Protein	Funktion	MW	pI	Genbank
Apolipoprotein A1	Apoptose, HDL, Cholesterinfreisetzung, Lipidstoffwechsel	30,8	5,56	NCBI 2914175
EnoylCoA Hydratase	mitochondriale Fettsäure β -Oxidation	31,4	8,34	NCBI 14286220
FLJ10292	hypothetisches Protein (Strausberg et al., 2002)	17,3	5,96	NCBI AAH10905
Glutathiontransferase GSTP1	Konjugation von reduziertem Glutathion	23,2	5,44	NCBI 321138
Initiationsfaktor 5a	eukaryontische Transkriptionsinitiation	16,7	5,08	NCBI NM_001970
Myosin regulatorische leichte Kette	reguliert die Zellkontraktilität	19,7	4,67	NCBI 5453740
Neuropolypeptid h3	Signaltransduktion, Raf Kinase Inhibitor	20,9	7,33	NCBI 913159
Phosphoglycerat Mutase 2	Phosphoglyceratmutase	28,6	9,00	NCBI 130353
Proteasom 26S Untereinheit	Gankyrin, non-ATPase regulatorische Untereinheit des 26S Proteasoms	24,4	5,71	NCBI 4506217
Proteasomen Activator PA28 α	Zusammenbau des Immunoproteasoms, verstärkt die Generierung von MHC-Klasse I Peptiden	28,7	5,78	NCBI 5453990

Protein	Funktion	MW	pI	Genbank
Proteasomen Activator PA28 β	Zusammenbau des Immunoproteasoms, verstärkt die Generierung von MHC-Klasse I Peptiden	27,4	5,44	NCBI I53518
Proteasome alpha Typ 2	Proteasomenuntereinheit	25,8	7,12	NCBI 12804095
Proteasome alpha Typ 6	Proteasomenuntereinheit	27,4	6,35	NCBI 8394076
Proteasome beta Typ 2	Proteasomenuntereinheit	22,8	6,52	NCBI S55040
Proteasome beta Typ 3	Proteasomenuntereinheit	22,9	6,14	NCBI S55041
Proteasome beta Typ 4	Proteasomenuntereinheit	29,2	5,72	NCBI 631345
Proteasome beta Typ 7	Proteasomenuntereinheit	30,0	7,58	NCBI AAH00509
Proteasome beta Typ 10	Proteasomenuntereinheit , MECL1	28,9	7,69	NCBI 4506191
ran	Signaltransduktion Ras/ERK Signalweg, GTP-Bindeprotein	24,4	7,01	NCBI TVHUC3
rho GDI beta	Signaltransduktion, inhibiert GDP Dissoziation von rho	23,2	5,03	NCBI 10835002

Protein	Funktion	MW	pI	Genbank
Splicefaktor p32	Inhibition der Complementfunktion oder Splicefaktor genaue Funktion unbekannt	31,4	4,74	NCBI 4930073
Stathmin	Regulation des Mikrotubuli Filament Systems Destabilisierung von Mikrotubuli	17,2	5,77	NCBI 5031851
Translationselongationsfaktor beta	Translationselongation	24,8	4,53	NCBI 4503477
Triosephosphat Isomerase	Glykolyse	26,5	6,51	NCBI 136066
Tropomyosin 3	Regulation der Muskelkontraktion	32,8	4,68	NCBI 24119203

PUBLIKATIONEN

Kronfeld, K., C. Hilmes, C. Huber und B. Seliger. 2001. Direct correlation of B7 expression levels with T cell stimulation. F9. Abstracts of the 32nd annual meeting of the German Society of Immunology. Dresden, September 26-29, 2001. *Immunobiology* 204:87.

Abken, H., A. Hombach, C. Heuser, K. Kronfeld und B. Seliger. 2002. Tuning tumor-specific T-cell activation: a matter of costimulation? *Trends Immunol* 23:240.

Seliger B. und K. Kronfeld. 2003. Therapeutic vaccination with B7-modified allogeneic tumor cells and GM-CSF as adjuvant in patients with metastatic renal cell cancer. a pilot study. III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Johannes Gutenberg-University, Mainz. *Kommission für Somatische Gentherapie, Bundesärztekammer Köln.*

Kronfeld, K., E. Hochleitner, S. Mendler, J. Goldschmidt, R. Lichtenfels, F. Lottspeich, H. Abken und B. Seliger. 2003. Proteome analysis of B7-activated T cells: New insights in B7-mediated T cell costimulation. G16. Abstracts of the 34nd annual meeting of the German Society of Immunology. Berlin, September 24-27, 2003. *Immunobiology* 208:67-68.

Kronfeld, K., H. Abken, C. Huber und B. Seliger. 2003. Distinct kinetics of B7-1 and B7-2 in the induction of a T-cell response: their impact for a HLA-matched and HLA-mismatched antitumor immunotherapy. *submitted to Clinical Cancer Research.*

Kronfeld, K., E. Hochleitner, S. Mendler, J. Fluck, J. Goldschmidt, M. Hoerner, R. Lichtenfels, F. Lottspeich, H. Abken und B. Seliger. 2003. The proteome-based identification of proteins induced in T lymphocytes upon B7 mediated costimulation. *submitted to Journal of Immunology.*

Publikationen zum Einfluss von B7-homologen Molekülen auf die zelluläre Vakzinierung von Nierenzellkarzinompatienten, zur Identifikation von Proteinnetzwerken und zur Entwicklung eines Systems zur Herstellung autologer B7 retroviraler Vakzine sind in Vorbereitung.

LEBENS LAUF

Geburtsdatum	21. Juni 1972
Geburtsort	Erbach/Odw
Eltern	Arnd Kronfeld, Bundesbahnobersekretär Karin Kronfeld geb. Schwarzer, Hausfrau
Adresse	Holzhofstrasse 16 55116 Mainz Tel.: 06131/603690 email: kronfeld@uni-mainz.de Handy 0174/7726644
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schul Ausbildung	1978 bis 1982 Stadtschule Michelstadt 1982 bis 1984 Theodor-Litt-Schule Michelstadt 1984 bis 1991 Gymnasium Michelstadt Sommer 1991 Abitur
Zivildienst	01.07.1991 bis 30.09.1992 beim DRK Odenwaldkreis im Krankentransport/Rettungsdienst Rettungssanitäter seit 18.09.1992
Studium	1992-98 Biologie (Diplom) an der TU Darmstadt (TUD)
Tätigkeit	01.04.-31.05.1998 wissenschaftlicher Angestellter TUD seit 01.06.1998 als wissenschaftlicher Angestellter an der Uniklinik Mainz, AG Seliger, III. Medizinische Klinik
Nebentätigkeiten	seit 1992 als Rettungssanitäter beim DRK Odenwaldkreis im Rettungsdienst 1996-97 als Pflegehilfe im Elisabethenstift Darmstadt Frühjahr 1996 Betreuung des Mikrobiologie Grundpraktikums an der TUD 1997-2001 als Dozent für Mikrobiologie, Physik und Chemie an der Krankenpflegeschule des Elisabethenstiftes Darmstadt
Hobbys	Badminton, Fußball als Rettungssanitäter und Mikrobiologe im Sanitätsdienst und Katastrophenschutz beim Malteser e.V. Mainz

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Barbara Seliger am Universitätsklinikum der Johannes Gutenberg Universität Mainz in der III. Medizinischen Klinik in der Zeit von Juni 1998 bis November 2003 angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, das ich die vorliegende Disseration selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher keinen Versuch unternommen habe, an einer deutschen oder ausländischen Universität zu promovieren.

Mainz, 28.11.2003

(Kai Kronfeld)